



Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré

Anne Kersante

► To cite this version:

Anne Kersante. Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré. Ecologie, Environnement. Université Rennes 1, 2003. Français. NNT: . tel-00007435

HAL Id: tel-00007435

<https://theses.hal.science/tel-00007435>

Submitted on 19 Nov 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° Ordre : 2938

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

Le grade de : **Docteur de l'Université de Rennes 1**

Mention : BIOLOGIE

PAR

Anne Kersanté

Equipe d'accueil : U.M.R. 6553 ECOBIO

Equipe Interaction Biologique et Transfert de Matière

Station Biologique de Paimpont

Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé

U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement

Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré.

Soutenue le 19 décembre 2003 devant la commission d'examen :

BARRIUSO Enrique	DR-INRA, Grignon	Examineur
BINET Françoise	CR-CNRS, Université de Rennes 1	Directeur de thèse
COUÉE Ivan	Professeur, Université de Rennes 1	Examineur
FRANCEZ André-Jean	MCF, Université de Rennes 1	Directeur de thèse
LAVELLE Patrick	Professeur, Université Paris VI	Rapporteur
SOULAS Guy	DR-INRA, Université de Bordeaux 2	Rapporteur

Avant-propos

Ce mémoire de thèse est le résultat d'un travail mené au sein de l'Institut Fédératif de Recherche CAREN (Centre Armoricaire de Recherche en Environnement) dans l'UMR 6553 Ecobio – Université de Rennes 1. Ce travail a nécessité des collaborations avec d'autres unités de recherche : Le CPB-CNRS de Nancy, l'UMR Microbiologie et Géochimie des Sols de l'INRA de Dijon et l'UMR Environnement et Grandes Cultures de l'INRA de Paris-Grignon.

Ce travail a été dirigé par François BINET (CR-UMR6553 Ecobio) en co-direction avec Paul TREHEN (PR-UMR6553 Ecobio) durant les 3 premières années, et avec André-Jean FRANCEZ (MC-UMR6553 Ecobio) durant la 4^e année.

Cette thèse a été financée par une bourse doctorale régionale accordée par le Conseil Régional de Bretagne. Ce travail de thèse a été financé par le programme de recherche **TRANZAT** issu de l'appel d'offre « Devenir des Contaminants dans l'Environnement et Effets sur les Ecosystèmes » lancé par le **Programme Environnement Vie et Sociétés du CNRS, comité Ecosystèmes et Environnement** puis par l'**ACI « Eau et Environnement »** du **Ministère de la Recherche**.

Remerciements

Je tiens à remercier le **Conseil Régional de Bretagne** pour son soutien financier, par l'attribution d'une bourse doctorale régionale (1999-2002).

Je tiens à remercier Mr **Paul Tréhen**, qui m'a accueillie au sein de l'UMR 6553 « ECOBIO », à la Station biologique de Paimpont et qui a participé à la direction de cette thèse pendant trois ans. Merci à **Pierre Marmonier**, pour son aide en tant que directeur de la Station.

Merci à **Françoise Binet** pour avoir initié cette thèse, pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de ses connaissances et de ses conseils et pour sa disponibilité. Merci aussi à **André-Jean Francez** pour ses conseils et son aide lors de cette 4^e année.

Je remercie Messieurs les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit : Messieurs **Patrick Lavelle** (Université Paris VI) et **Guy Soulas** (Université de Bordeaux 2) en tant que rapporteurs et **Enrique Barriuso** (INRA-Grignon) et **Ivan Couée** (Université de Rennes 1) en tant qu'examineurs.

Parmi les laboratoires et dans l'ordre de passage, je tiens à remercier :

Jacques Berthelin pour m'avoir accueillie au sein du CPB-CNRS de Nancy, **Colette Munier-Lamy**, mais surtout **Marie-José Belgy** pour son aide, ses conseils en extraction et en radioprotection et toute la formation qu'elle a su me transmettre dans la bonne humeur.

Nancy sans **Babath** ne serait pas vraiment Nancy, alors merci pour tous tes sourires, tes blagues (sur les perroquets, les ptits pois et les autoclaves...) et nos discussions chez M'sieur Vautrin. Merci aussi à Najat, Bob "Philippe Sinclair", Ginhwa, Roberto et aussi Hocine, Yacine et surtout **Azzedine** pour leur accueil algérien familial et chaleureux.

Merci à **Guy Soulas** de m'avoir accueillie à l'INRA de Dijon et merci pour l'intérêt porté à cette étude. Mille Mercis à **Fabrice Martin** qui de A à Z m'a permis d'approcher une petite partie du monde de *Pseudomonas*. C'est par son enthousiasme et son écoute constante que la génétique est redevenue accessible et amusante. Merci... Merci aussi à **Stéphanie, Laurent et Nadine**.

Dijon et **Marion** me ramènent aux PCR enchaînées et au **Benoît** déchaîné. Merci, Marion pour tous tes p'tits coups de main et pour les pauses partagées, avec plaisir. Merci Benoît, pour tout ce qui reste fou fou fou...

Merci à **Enrique Barriuso** de m'avoir accueillie au sein de l'INRA de Grignon. Merci à **Marie-Paule Charnay** pour son accueil non mesuré, ses conseils et le temps accordé et à **Hélène** et **Valérie** pour tous les coups de main.

Un gros coucou à ma compatriote de déplacement et de manip : **Kawtar** et ses thés enchanteurs, **Laure** simplement parce que c'est elle la drôle de Dame, **Mohammed** (alias Bosley) qui n'oubliera pas les gâteaux bretons des thés clandestins, **Marisol** et ses fous rires du

matin et **Cédric** Le Charly organisateur qui a tout comme les autres contribué à alléger le temps du déplacement. Merci ENORMEMENT à vous tous !!

Un gros Merci à **Tonio**, un indépendant qui s'est préoccupé de mes week end...merci merci merci...

Je tiens également à remercier **Alain Bouchereau** pour m'avoir permis de réaliser mes analyses au sein de son laboratoire et **Ivan Couée** pour m'avoir permis de m'installer de temps en temps. Merci surtout à **Nathalie Josselin**, pour son aide en manip mais surtout pour toutes ces petites choses de la vie.

Naturellement je tiens à remercier les membres du personnel présent et passé de la Station Biologique de Paimpont, pour leur aide, leur soutien et leur présence.

Yannick Delette celui qui au cours des nombreuses discussions au milieu des Empidides est devenu un ami, **Pierre Marmonier** pour sa patience vis à vis des plaisanteries, pour son rire, son soutien et son aide, **Yves Picard** pour ses coups de main généreux, **Philippe Vernon** pour les discussions entre deux passages éclairs, **Alain Bellido** et ses conseils stats, **Yves Frenot** pour ses bonjours du samedi, **Daniel Cluzeau** pour les discut' bonne humeur, **Yann Colin** pour ses moulinettes informatiques plus que bienvenues et le temps accordé, et enfin notre maître du monde **Marc Lebouvier**...eh ben voilà, ...ça y'est ! Ca va, Marc ?

Je n'oublie pas **Maryvonne** et son rire qui mettrait même « nounours » de bonne humeur, **Gwen** qui m'a aidée de son efficacité de « née un 24 mars » et pour son humour-latteur tout aussi efficace, **Valérie** et son ENORME gentillesse qui la caractérise, promis un jour je te ramènerai Robbie...Un gros bisou à ma **Christine**, toute gentille.

Merci un bon milliard de fois à mon **Michel Lefeuvre** sans qui cette thèse ne serait jamais arrivée à son terme : merci pour les mésocosmes (72 !!!!), les microcosmes..., toutes les astuces de bricoleur malin mais surtout merci à mon Pot' de virée en camion, de terrain, de pique-niques organisés dans la bonne humeur, de cafés et de taquinage du « Bourgeois », merci Gabriel !!!! ...

Merci à **Julien** qui au cours de son stage de maîtrise nous a beaucoup aidé sur le terrain.

La grande **Clairette**, ses fous rires et sa présence et les milliers de coups de pelle et de main sur le terrain, et **Toff**, qui me fera toujours mourir de rire ; alias le comité d'accueil des débuts à la station. Merci à tous les deux. Je n'oublie ni **Loudo** qui ne venait pas d'avoir Disouhit'ans, ni mon protégé de bureau **Franzouss** alias Gordon, **Davidou** super doux et ses taquineries du matin, **Florence** son sourire et son soutien.

Une petite pensée pour tous les taafiens qui passent et qui nous laissent comme un goût de voyage ... **Justine**, **Djé-Djé-Tori**, **Gaëlle-la-Folle**, les **Tanches** (Jak Mat et Fred), **Patrick** et Les tarlouzes jumelles (**Pe&Co**) mais surtout je salue avec plaisir le retour du taafien...la revanche, merci pour ton soutien et ton sourire **Damien**.

Un coucou à **Bego**, à **Sego**, **AnneCha**, **Indrani** et ma p'tite **AnnePo** compagne de manip de folaïe. Merci à tous ceux que je ne cite pas pour les soirées délires...

Léon mon brother grec de toujours et ses thés chediznaït au coin de la table, toujours chaleureux, merci pour toutes ces magic soirées improvisées. **Guéno** pour son soutien... n'oublie pas, je crois que tu as un gatô de retard ! Merci pour tout le soutien de mon P'tit **Pierre-Utah**, son pacman-œil critique et sa générosité à toute épreuve. **Sylvain**, le roi des no4 et blagues en tout genre et spécialement pour tout le soutien de fin de rédaction et tous les biblio-auteurs qu'il peut maintenant citer en société. Merci à ma P'tite **Méli-Mélo** champomy-max pour son soutien et l'O₂ de semaine et de week-end, pour les soirées châtaignes dont même Lupa ne se remet pas, un gros bisou ! **Patrick** aïe....mais t'es pas bien toua ! dont mes épaules n'oublieront pas les supplices mais qui reste un peu mon grand frère de la station, ben ouais ...ça calme, ça ! **Arnô** le passeur aux bonbons et au rire magique qui s'attarde pour mon plus grand plaisir. Mon Gamin adoré **Jéréemiah** (pas encore Johnson) dont je ne compte plus les coups de main pour le terrain, pour les lots de vers interminables et pour tous les jours... merci en poussière de Clochette ! et merci aussi à mon **Yoyod**, mon frère d'arme, qui même éloigné de mon rézo, sera toujours connecté...

Merci enfin à mon trio magique des coups durs et des éclats de joie... :

Mes deux moitiés à moi, my connected-**Roro** et Yeliel-**Alban** qui m'offrent bien plus que des épaules et qui sont bien plus que ... TouT ! Quant à ma **Ti-boops-Fredette**, un mélange de pile et de kinder-surprise en concentré, tu viens peut-être de Vénus mais surtout d'une autre planète pour amener un tout autre soleil de Joga et merci n'est pas assez...pour ma Super-Copine souper chouette !

Merci à **Ch'ti Christian** qui m'a soutenue et accompagnée durant ces années, **Ch'tite Lupa** qui enronronne les heures...

Un Merci inimaginable et un énorme bisou à mon granit salé, ma famille : **Pierrot&Marité**, le duo magique au soutien et dévouement multiple, infatigable et plein de vie, mes adorables et adorés **Titi et Karine**, **Franky** «même pas cap'» et **Les 3G**, mes p'tis Breizhous en puissance.

*Vos vers sont bien tournés, les rimes sont belles ;
Certes les pieds y sont, mais je cherche les ailes.*
Guichard (1731-1811)

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE..... 1

I.1 PROBLEMATIQUE ENVIRONNEMENTALE LIEE A L'USAGE DES PESTICIDES	3
<i>I.1.1 Usage des pesticides</i>	<i>4</i>
<i>I.1.2 Etendue des risques liés à l'usage des pesticides.</i>	<i>5</i>
I.1.2.a Risques sanitaires et toxicité pour l'homme.....	5
I.1.2.b Risques sanitaires et écologiques à l'échelle de l'écosystème	6
I.2 LES PESTICIDES A USAGE AGRICOLE	9
<i>I.2.1 Classification des molécules</i>	<i>9</i>
<i>I.2.2 Dynamique des pesticides dans les écosystèmes.....</i>	<i>9</i>
I.2.2.a Schéma conceptuel de base	9
I.2.2 b Caractéristiques déterminant le devenir des molécules.....	11
<i>I.2.3 Devenir de l'atrazine : principaux processus connus.....</i>	<i>13</i>
I.2.3.a Adsorption et rétention de l'atrazine	14
I.2.3.b. Dégradation et minéralisation	17
I.2.3.c. La dégradation de l'atrazine et les concepts attenants.....	18
I.3 BIOTURBATION DES SOLS PAR LA MACROFAUNE LOMBRICIENNE	21
<i>I.3.1 Diversité lombricienne et diversité des modes d'action.....</i>	<i>21</i>
<i>I.3.2 Les lombriciens, organismes ingénieurs des sols.....</i>	<i>23</i>
I.3.2.a Hétérogénéité des structures créées par les lombriciens	24
I.3.2.b Hétérogénéité des processus liés à l'action des lombriciens	26
I.4 CADRE DE L'ETUDE ET HYPOTHESES DE RECHERCHE	30

CHAPITRE II METHODOLOGIE, EXPERIMENTATION CONTROLEE ET

CHANGEMENT D'ECHELLE..... 33

II.1 INTRODUCTION	35
II.2 LES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX.....	37
<i>II.2.1 Les enceintes expérimentales.....</i>	<i>37</i>
II.2.1.a Etude au laboratoire, en microcosme de sol.....	37
II.2.1.b Etude au terrain, en mésocosme	37
<i>II.2.2 La terre</i>	<i>38</i>
<i>II.2.3 Les lombriciens</i>	<i>39</i>
<i>II.2.4 Inoculum de Pseudomonas sp. ADP.....</i>	<i>41</i>

II.2.5 L'apport trophique.....	41
II.2.6 Apport de l'herbicide.....	42
II.2.7 Incubation et maintenance des dispositifs.....	44
II.3 LES EXPERIMENTATIONS ET LEURS MODALITES.....	45
II.3.1 Expérimentation 1, au laboratoire en microcosmes : minéralisation, distribution et biodisponibilité de l'atrazine.....	45
II.3.2 Expérimentation 2, au laboratoire : minéralisation potentielle de l'atrazine à l'échelle des microsites de sol.....	46
II.3.3 Expérimentation 3, au laboratoire : minéralisation de l'atrazine, interactions lombriciens-microorganismes à l'échelle des microsites.....	47
II.3.4 Expérimentation 4, au terrain au laboratoire : minéralisation, distribution et biodisponibilité de l'atrazine.....	48
II.3.5 Microsites de sol représentatifs.....	48
II.3.5.a Description.....	48
II.3.5.b Incubation.....	50
II.4 ANALYSES ET DOSAGES.....	51
II.4.1 Suivi biologique des vers.....	51
II.4.2 Minéralisation du carbone total et de l'atrazine en particulier.....	51
II.4.2.a Suivi de l'activité respiratoire par titrimétrie.....	51
II.4.2.b Suivi de la minéralisation de l'atrazine par dosage de la radioactivité.....	52
II.4.3 Distribution, disponibilité et mobilité de l'atrazine.....	53
II.4.3.a Extraction des résidus d'atrazine ¹⁴ C et quantification des résidus non extracibles à partir du sol.....	54
II.4.3.b Identification des métabolites de l'atrazine présents aux sein des échantillons.....	56
II.4.3.c Répartition des résidus non extractibles de l'atrazine dans les fractions de la matière organique.....	57
II.4.4 Analyse des communautés microbiennes.....	58
II.4.4.a Extraction des acides nucléiques.....	58
II.4.4.b Analyse des acides nucléiques.....	59
II.5 TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	60
CHAPITRE III INDICATEURS DES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX AUX DIFFERENTES ECHELLES D'INVESTIGATION : MICROSITES, MICROCOSMES ET MESOCOSMES.....	61
III.1 ACTIVITE BIOLOGIQUE DU SOL.....	63
III.1.1 Activité respiratoire au sein de microsites de sol.....	63
III.1.2 Activité respiratoire en microcosmes.....	65
III.1.3 Activité respiratoire du sol, au terrain, en mésocosmes.....	67
III.1.4 Activité respiratoire des lombriciens.....	68

III.2 EFFET DE L'ATRAZINE SUR LA BIOLOGIE ET L'ACTIVITE DES LOMBRICIENS	71
III.2.1 Evolution de la biomasse lombricienne.....	71
III.2.2 Indices d'activités mécaniques des lombriciens : litière, turricules et cocons.....	73
III.3 DISCUSSION	75
III.3.1 Influence de l'atrazine.....	75
III.3.2 Influence des lombriciens.....	75
III.3.3 Influence croisée de l'atrazine et des lombriciens	77
III.3.4 Dynamique temporelle de l'activité respiratoire.....	77
III.3.5 Réponse des lombriciens à l'écotoxicité de l'atrazine	78
CHAPITRE IV MINERALISATION DE L'ATRAZINE ET IMPORTANCE DES	
INTERACTIONS LOMBRICIENS – MICROORGANISMES.....	81
IV.1 MINERALISATION DE L'ATRAZINE.....	83
IV.1.1 Le constat : minéralisation ralentie en présence de vers	83
IV.1.1.a A l'échelle des colonnes de sol : les microcosmes	83
IV.1.1.b A l'échelle des mésocosmes, au terrain.....	87
IV.1.1.c A l'échelle des microsites de sol : minéralisation potentielle de l'atrazine.....	88
IV.2 MECANISMES IMPLIQUES DANS LE RALENTISSEMENT DE LA MINERALISATION	93
IV.2.1 Effets du pré-traitement atrazine et des vers de terre sur la structuration des communautés microbiennes du sol.....	93
IV.2.1.a Rendement d 'extraction.....	93
IV.2.1.b Communautés microbiennes au sein des microsites de sol	94
IV.2.2 Effet du pré-traitement atrazine et des vers de terre sur l'activité des communautés microbiennes	99
IV.2.2.a Niveau d'activité de la microflore au sein des microsites de sol.....	99
IV.2.2.b Cinétique de minéralisation de l'atrazine	100
IV.2.2.c Quantification du nombre de copie des gènes Atz A, B et C par PCR en temps réel	104
IV.3 DISCUSSION	107
IV.3.1 La présence des lombriciens ralentit la minéralisation de l'atrazine	107
IV.3.2 Hétérogénéité spatiale et temporelle de la minéralisation de l'atrazine, à l'échelle du microsite	109
IV.3.3 Minéralisation accélérée	112
CHAPITRE V MOBILITE ET DISPONIBILITE DE L'ATRAZINE DANS LE SOL : ROLE	
REGULATEUR DES LOMBRICIENS	115
V.1 REDISTRIBUTION ET DISPONIBILITE DE L'ATRAZINE	117
V.1.1 A l'échelle du microcosme	117
V.1.2 Au terrain, en mésocosmes.....	121

V.1.3 Mécanismes impliqués dans la redistribution de l'atrazine	124
V.1.3.a Influence de la matière organique.....	124
V.1.3.b Répartition des résidus non-extractibles au sein des fractions de la matière organique ...	125
V.2 VOIES DE DEGRADATION DE L'ATRAZINE AU SEIN DES MICROSITES DE SOL.....	126
V.3 MOBILITE DE L'ATRAZINE	127
V.3.1 Flux d'eau et d'atrazine dans le sol.....	127
V.3.1.a Volumes d'eau lixiviés	127
V.3.1.b Quantité de radioactivité lixiviée.....	128
V.3.2 Concentrations lixiviées d'atrazine et de ses métabolites.....	129
V.3.3 Métabolites de dégradation et action des lombriciens	131
V.3.4 Contamination potentielle (manip terrain –40cm)	131
V.4 BUDGET DE L'ATRAZINE AU SEIN DES DISPOSITIFS D'ECHELLES DIFFERENTES	133
V.4.1 Au laboratoire, en microcosmes	133
V.4.2 Au terrain, en mésocosmes.....	135
V.4.3 Bilan des expérimentations	135
V.5 DISCUSSION	137
V.5.1 Redistribution de l'atrazine à l'échelle des microsites	137
V.5.2 Le microsite galerie	137
V.5.3 Le microsite turricule.....	139
V.5.4 Disponibilité de l'atrazine	142
V.5.5 Mobilité et lixiviation de l'atrazine.....	144
CHAPITRE VI CONCLUSION	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	181

CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE

I.1 Problématique environnementale liée à l'usage des pesticides

Ce travail de recherche se rapporte aux problèmes environnementaux liés à l'usage des pesticides en agriculture. Pour satisfaire une productivité végétale grandissante, les milieux en particulier les sols, ont été intensivement utilisés. Cette intensification de l'utilisation des milieux se traduit par un agrandissement des parcelles, une diminution des couvertures végétales pérennes, une exportation accrue de biomasse et des apports supplémentaires d'intrants, pesticides et fertilisants. Ces modifications d'usage des milieux favorisent à la fois l'érosion des sols, leur appauvrissement en carbone ainsi qu'une pollution diffuse généralisée des sols, des eaux et de l'air par les surplus d'éléments apportés. Ainsi un des impacts majeurs concerne l'enrichissement des eaux marines et continentales en azote et en phosphore. De même les apports de pesticides et la multiplication des expositions à long terme constituent un risque supplémentaire de pollution diffuse.

Projetés dans le futur, ces changements laissent présager des impacts sur la biodiversité, la composition et le fonctionnement des écosystèmes « naturels », c'est à dire des écosystèmes non-agricoles environnants les agrosystèmes (Tilman, 1999). Ainsi se pose la question générale de la réactivité et du temps de réponse de ces écosystèmes non agricoles aux modifications d'usage apportées (concept de résistance et résilience des écosystèmes). Or le maintien d'une biodiversité des systèmes non agricoles est tout autant nécessaire au développement des cultures (pollinisation, prédateurs...) qu'à leur capacité à fournir des services à la société (Tilman, 1999).

Ce travail de recherche s'inscrit dans le contexte de contamination des sols par les pesticides utilisés en agriculture. Cette problématique est un enjeu majeur et actuel puisque l'étendue spatio-temporelle de la contamination est méconnue. La pollution diffuse et multiple des milieux représente en effet, des risques pour les communautés non cibles des écosystèmes, pour le fonctionnement des cycles biogéochimiques et pour l'homme, notamment avec la contamination des sols et des nappes phréatiques. Il s'agit donc de mieux comprendre la dynamique des pesticides dans les écosystèmes pour mieux en évaluer les risques *a priori*.

I.1.1 Usage des pesticides

La consommation de pesticides en France représente environ 110 000 tonnes par an, dont l'essentiel est utilisé en agriculture (96 936 tonnes en 2001, UIPP – UPJ, 2001). Les herbicides à usage agricole représentaient alors près de 31 000 tonnes, soit 29 % des pesticides. La France est le troisième consommateur mondial, après les Etats-Unis et le Japon et le premier utilisateur de pesticides en Europe en raison de l'étendue de sa Surface Agricole Utile (22 % de la SAU de l'Union Européenne). Les pesticides, étymologiquement « tueurs de fléaux », sont des produits dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des végétaux. Ils sont destinés à détruire, limiter ou repousser les organismes nuisibles à la croissance des plantes (insectes, parasites et adventices). Les pesticides utilisés pour la protection des végétaux sont appelés produits phyto-pharmaceutiques (directive 91/414/CE) ou communément produits phytosanitaires et les autres, biocides (directive 98/8/CE). Par exemple, un insecticide sera un produit phytosanitaire s'il est utilisé sur du blé mais un biocide dès lors qu'il est utilisé sur du bois de charpente. Les données sur l'utilisation des pesticides ne sont disponibles publiquement que par grandes catégories (figure I.1). Ces catégories séparent les pesticides selon les organismes nuisibles ciblés : les fongicides (51 % d'utilisation en 2000 en France, UIPP – UPJ, 2001), les herbicides (38 %), les insecticides (3 %) et d'autres pesticides à usage moins important, les acaricides, les nématicides, les rodenticides et molluscicides. Les pesticides sont obtenus par synthèse chimique de 10 à 15% de matières actives, le reste étant constitué de supports et adjuvants destinés à accroître leur efficacité. Les produits phytosanitaires actuellement utilisés en France représentent un panel de 500 molécules actives qui sont commercialisées sous forme d'environ 8000 préparations (IFEN, 2002).

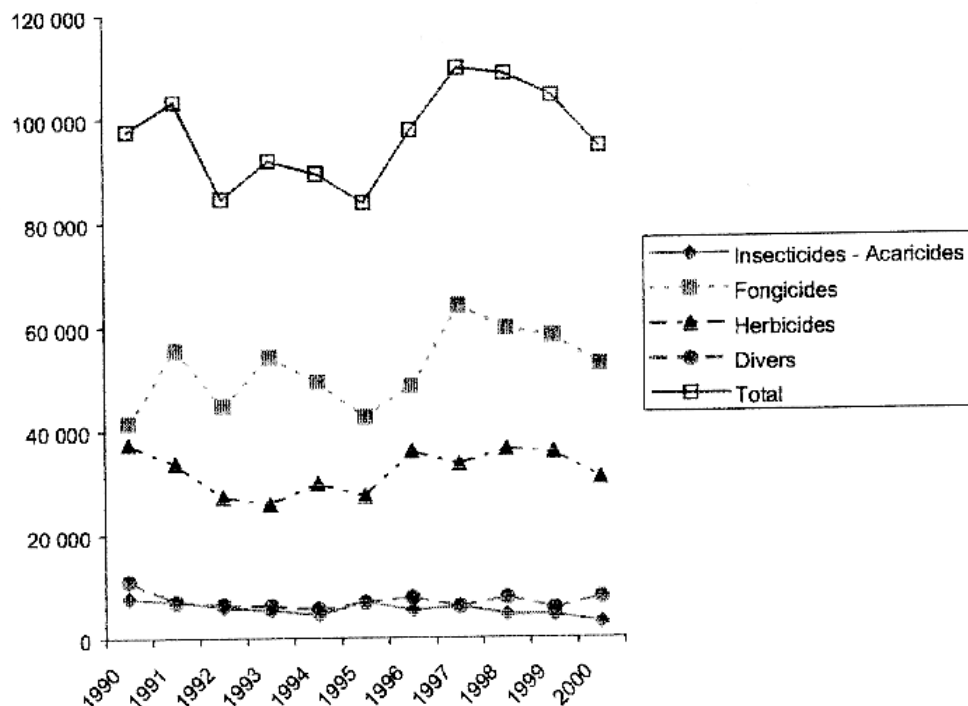


Figure I-1 : Quantités de substances actives commercialisées en France de 1990 à 2000 basées sur les déclarations (volontaires) des adhérents de l'Union des industries de la Protection des Plantes (en tonnes) (CPP, 2001).

I.1.2 Etendue des risques liés à l'usage des pesticides.

Au delà de leur effet sur les organismes ciblés, ces molécules présentent des risques pour l'homme et pour les écosystèmes avec des impacts immédiats ou à long terme, variables dans la nature et l'intensité des préjudices portés.

I.1.2.a Risques sanitaires et toxicité pour l'homme

Pour les populations exposées les risques sanitaires sont de nature cancérigène, affectent la reproduction, le développement ou sont d'ordre neurologiques ou neuro-comportementaux. L'intensité des risques sanitaires est fonction du degré d'exposition des populations (profession, proximité des zones traitées, consommation d'eaux et d'aliments contaminées) ou de leur sensibilité (âge).

Pour l'homme l'atrazine est classé comme « produit nocif » dont les effets se manifestent après inhalation ou contact dermique. Toutefois les risques d'effets graves apparaissent en cas d'exposition prolongée par ingestion (dose journalière acceptable est de $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel). Cet herbicide est présumé toxique pour l'homme et ses effets sont suspectés se répercuter sur la reproduction. Il est en effet un perturbateur endocrinien inhibiteur de la testostérone, de la progestérone et des oestrogènes. Des perturbations de la reproduction

sexuée (hermaphrodisme et perte de caractères sexuels secondaires) chez la grenouille *Xenopus laevis* ont été récemment observés pour des expositions à des doses réalistes d'atrazine (Hayes *et al.*, 2002). L'atrazine perturbe aussi le système immunitaire, augmentant ainsi les risques de cancer et de maladies infectieuses. Des études en laboratoire ont montré qu'il pouvait causer des troubles génétiques et retarder la puberté. En revanche, l'atrazine a été classé non cancérogène par le Centre international de recherches sur le cancer en 1998. Aujourd'hui, les inquiétudes viennent moins de la molécule que de son métabolite, le DEA, considéré comme plus toxique que la molécule mère (PAN, 2001).

L'usage des pesticides dans la production des produits d'alimentation est étroitement réglementé. Les Limites Maximales de Résidus, LMR (exprimées en milligrammes par kilo) sont fixées au niveau national, européen ou international (CPP, 2001). Elles sont fixées par produit et par catégorie de fruit (avec notamment des limites spécifiques pour les pommes et le raisin de table...). L'écart entre les limites peut varier et ainsi la teneur en résidus de pesticides tolérée dans les fruits est 100 à 500 000 fois plus élevée qu'elle ne l'est dans l'eau potable. Cependant 47 % des échantillons prélevés en Europe (2001) contiennent des résidus de pesticides à des doses inférieures aux LMR et 4 % en moyenne, dépassent ces LMR (EU-FVO, 2003).

I.1.2.b Risques sanitaires et écologiques à l'échelle de l'écosystème

En fonction des conditions d'utilisation et selon les caractéristiques du milieu, ces molécules actives sont susceptibles de se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement (air, sol, eau, sédiments...). Les contrôles en aval sont encore les seuls outils disponibles pour évaluer *a posteriori* l'étendue de la contamination et les risques encourus.

✓ Risques pour la ressource en eau

En Europe, depuis 1988, pour les eaux destinées à la consommation humaine les Concentrations Maximales Admises (CMA) sont respectivement, par substance et pour l'ensemble des substances, 0,1 et 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans l'eau de boisson (80/778/CEE), et 2 et 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les eaux brutes pour la production d'eau potable. En ce qui concerne les eaux souterraines, aucune norme n'est imposée mais le Système d'Evaluation de la Qualité des Eaux (SEQ) a introduit la notion d'état patrimonial pour exprimer un degré d'altération. Il se traduit par un dépassement ou non du seuil de détection du produit concerné (atrazine : 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Dans un objectif de protection de la qualité des eaux, une réduction de l'usage de l'atrazine a été mise en place avec i) une diminution des doses d'emploi (la dose homologuée fixée à 2,5 $\text{kg.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$ en 1959 a été successivement réduite à 1,5 en 1990, puis à 1 $\text{kg.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$ en 1997–JO 15/2/97), ii) une restriction des usages (interdiction des épandages sur les zones non agricoles telles que jardins, fossés, bordures des voies : avis JO du 4 juillet 1997) – (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Des interdictions locales ont été décidées en 1998. Ce fut

notamment le cas en Bretagne où des arrêtés préfectoraux d'interdictions temporaires d'utilisation de l'atrazine à proximité des cours d'eau et des points de captage ont été mis en place. En France, malgré les limites instaurées, une pollution généralisée par certaines substances de la ressource en eau de surface et littorale est atteinte (IFEN, 2002), les eaux souterraines étant moins touchées.

Malgré les précautions imposées, des dépassements fréquents et importants du seuil d'atrazine dans les prélèvements d'eau potable, d'eaux souterraines ont été constatés (DDASS et DRASS -directions départementales et régionales des affaires sanitaires et sociales). Une distribution trop fréquente d'une eau non conforme au regard du paramètre atrazine a été constatée dans les 10 départements du Grand Ouest (départements des régions Bretagne - Pays de Loire et département des Deux-Sèvres) où 2,7 millions de personnes ont été alimentées en 1997 par une eau non conforme. En Ille et Vilaine en 2001, 11 communes (26563 habitants) se sont vues distribuer une eau non conforme à la norme de potabilité.

La CORPEP a recherché la présence de matières actives dans les rivières bretonnes (l'Aven, l'Arguenon, le Gouessant, la Rance, la Seiche, la Flume et le Meu) en période pluvieuse prenant ainsi en compte les pics de pollution liés au ruissellement (Tableau I-1). Le nombre de molécules décelées dans les eaux de surface est de plus en plus élevé entre 1997 et 2000. A l'inverse, l'importance des dépassements élevés (1 µg soit 10 fois le seuil) et les concentrations maximales ont, dans l'ensemble, baissé après les restrictions. En revanche, l'impact des restrictions est faible sur la fréquence de détection, même à des niveaux élevés comme pour l'atrazine fréquemment détectée deux ans après son interdiction d'usage à proximité des cours d'eau. L'effet des interdictions et des restrictions est donc très progressif et temporellement décalé.

Tableau I-1 : Fréquences de détection et pic de concentration de l'atrazine et l'isoproturon dans les rivières bretonnes entre 1997 et 2000 (CPP, 2001).

	Atrazine (désherbant maïs)				Isoproturon (désherbant blé)			
	1997	1998	1999	2000	1997	1998	1999	2000
Nombre de recherches	51	62	70	77	19	60	61	78
% d'analyses > 0,1 µg.L⁻¹	96 %	81 %	66 %	64 %	71 %	35 %	38 %	27 %
% d'analyses > 1 µg.L⁻¹	51 %	24 %	7 %	9 %	-	7 %	15 %	-
Pics observés (µg.L⁻¹)	29	4,1	6,3	11,1	0,5	5	7,7	0,8
Lieu du pic	Flume	Arguenon	Flume	Flume	Flume	Rance	Gouessant	Rance

L'interdiction (avis du 27 novembre 2001 et autorisation d'utilisation jusqu'au 30 septembre 2003) fait suite i) à l'inquiétude provoquée par la fréquence et l'importance de la contamination

des eaux par l'atrazine, ii) au faible effet des mesures de restrictions d'usage sur les détections dans les eaux iii) à l'effet retard des contaminations par l'atrazine dû à sa persistance et aux processus complexes de diffusion dans les sols. Elle est également motivée par l'observation d'une efficacité de moins en moins avérée de l'atrazine et de ses dérivés, liée non seulement à la réduction des dosages autorisés mais aussi à l'apparition de phénomènes de résistances de certaines mauvaises herbes à cette famille de pesticides.

✓ Risques pour les organismes aquatiques

En ce qui concerne les organismes aquatiques, le SEQ reconnaît des concentrations au dessus desquelles le maintien de la diversité et de l'abondance spécifique est difficile. La toxicité de l'atrazine est avérée sur le milieu aquatique (effet inhibiteur sur les plantes aquatiques, mort d'invertébrés pour de faibles doses : 0,2 à 7 mg/litre d'eau pendant 2 jours d'exposition). La dose létale se situe entre 0,75 et 4 g d'atrazine par kilo de poids d'animal (IFEN 2002).

✓ Risques pour la qualité de l'air

La présence de produits phytosanitaires dans l'atmosphère a été montrée aussi bien en milieu rural, qu'en milieu urbain (Trevisan *et al.*, 1993 ; Chevreuil *et al.*, 1996 ; Sanusi *et al.*, 1997). Ces composés peuvent être soumis au transport atmosphérique. La diffusion est possible sur de grandes distances comme en témoigne la détection de pesticides organochlorés dans les précipitations en Antarctique (Bidleman *et al.*, 1993). Aucune norme française ou européenne n'existe concernant le prélèvement ou l'analyse des produits phytosanitaires dans l'air ambiant.

Pour un xénobiotique agricole, le sol est le compartiment obligatoire précédant son transfert vers les compartiments aquatiques (eau de surface et souterraines). L'étude spatio-temporelle de la contamination des sols et les risques envers i) les communautés non cibles qu'il abrite, ii) le fonctionnement des cycles biogéochimiques et, par effet retard, iii) envers les milieux aquatiques sont mal connus. Appréhender les risques sanitaires et écologiques des produits phytosanitaires nécessite de prendre en compte les processus physico-chimiques et biologiques susceptibles d'intervenir en amont dans les sols. En effet, le risque toxicologique d'un produit phytosanitaire réside autant dans sa transformation biotique et abiotique des molécules (métabolites) que dans les modalités de circulation, d'accumulation et / ou de rétention dans les sols (persistance). Ainsi l'accumulation, la rétention puis la remobilisation et l'accessibilité aux organismes des molécules et métabolites aux différents niveaux d'organisation du sol (moléculaire, organismes ingénieurs, microsites, interface matrice / solution, profil de sol) demeure une question ouverte à ce jour.

I.2 Les pesticides à usage agricole

I.2.1 Classification des molécules

De façon générale, les nombreuses molécules pesticides utilisées sont classées en familles chimiques selon la similitude de leur structure chimique : l'atrazine fait partie des s-triazines. Récemment, une nouvelle classification des pesticides suivant les propriétés chimiques qui déterminent leur comportement dans les sols et eaux (figure I.2) a été proposée (Gevao *et al.*, 2000).

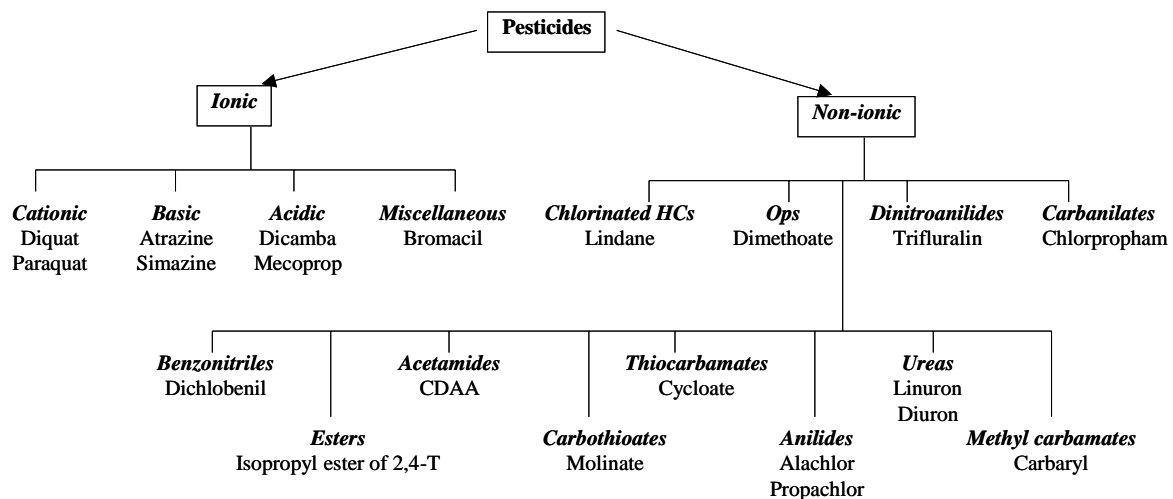


Figure I.2 Classification des pesticides, d'après Gevao *et al.* (2000).

I.2.2 Dynamique des pesticides dans les écosystèmes

Dans un premier temps, les principales voies d'évolution des molécules dans le sol seront présentées. Puis nous décrirons les caractéristiques majeures de la molécule et du milieu qui interagissent et déterminent l'évolution des produits phytosanitaires appliqués sur les sols.

I.2.2.a Schéma conceptuel de base

Les quantités de pesticides dans les sols, sous forme adsorbée ou dissoute, sont dépendantes de la quantité appliquée au départ, des caractéristiques du milieu mais aussi des caractéristiques propres aux molécules. C'est sous la forme dissoute que les produits sont le plus rapidement absorbés par les plantes mais aussi les plus susceptibles d'être dégradés ou mobilisés. L'efficacité des produits dépend de leur devenir et seule une partie de la dose

appliquée atteint l'organisme-cible. Le reste subira des transformations en fonction de facteurs physico-chimiques, climatiques et biologiques (figure I.3).

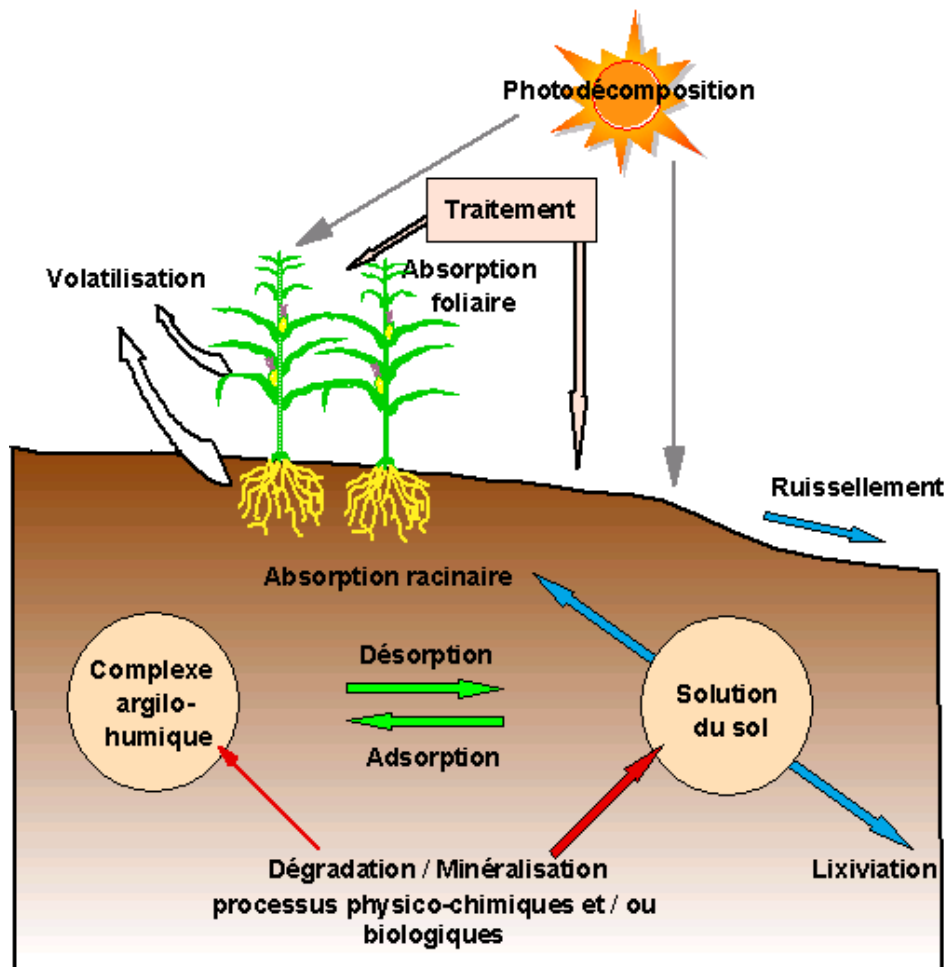


Figure I.3 Schéma conceptuel des voies d'évolution des pesticides

Les différents processus en jeu dans le devenir des pesticides sont donc :

La volatilisation. Elle correspond, pour les composés les plus volatils, au transfert vers l'atmosphère. Elle se produit principalement pendant l'application, et après pour les quantités de produits qui restent à la surface du sol ou des plantes. Les facteurs en jeu sont la pression de vapeur des molécules, les coefficients de partage (air / eau, air / phase solide) et la température (Jamet et Deleu, 1993). Certains composés très volatils sont appliqués par incorporation dans le sol.

La photodécomposition est la dégradation de la molécule sous l'action de l'énergie lumineuse et elle se produit à la surface du sol ou des plantes.

Le transfert s'opère soit latéralement par ruissellement, soit verticalement par lixiviation. Il peut également avoir lieu en phase soluble ou en phase solide. Le transfert de la molécule dans les

sols est lié à de nombreux facteurs comme la pente, les caractéristiques de précipitations ou d'irrigation, la stabilité structurale du sol, les pratiques agricoles ou la couverture végétale, mais aussi à la solubilité de la molécule dans l'eau ou à son adsorption. C'est ainsi qu'à partir de la surface ou d'autres horizons du sol, les pesticides contribuent à la contamination des eaux superficielles et des nappes phréatiques.

L'adsorption. Il s'agit de l'accumulation des molécules phytosanitaires par attraction moléculaire aux interfaces des différents constituants du sol comme la matière organique, les oxydes, les argiles (Khan, 1978 ; Jamet et Deleu, 1993). Une autre définition est donnée par Vallet (1988) ; c'est la fixation partielle d'un soluté qui passe de la phase en solution à la phase solide par mise en jeu de liaisons. Elle se produit soit en phase liquide, soit en phase gazeuse du sol (Jamet et Deleu, 1993).

La désorption correspond au mécanisme inverse. C'est le passage en solution du pesticide adsorbé, par suite d'une diminution de l'herbicide dissous ou par dégradation de l'adsorbant comme la matière organique.

La dégradation est constituée de l'ensemble des phénomènes par lesquels une molécule est métabolisée et peut suivre plusieurs voies réactionnelles : oxydoréduction, hydrolyse, substitutions radicalaires, enzymatiques. L'altération, biotique ou abiotique, est une dégradation partielle et conduit à la formation de nouveaux composés (métabolites ou résidus de dégradation). La **minéralisation** correspond à l'élimination totale en molécules de faible poids moléculaire (CO_2 , H_2O , Cl^- ...). Elle est essentiellement biotique mais des processus abiotiques peuvent également intervenir dans la minéralisation (Scheunert, 1992).

I.2.2 b Caractéristiques déterminant le devenir des molécules

La nature chimique de la molécule est le premier facteur en jeu. Bailey et White (1970) distinguent quatre facteurs déterminants du caractère chimique de la molécule pesticide qui influencent leur adsorption sur les colloïdes de sol. La nature des groupes fonctionnels (carboxyl, carbonyl, hydroxy et amino), la nature et la position des groupes de substitution, et les insaturations au sein de la molécule. La charge d'une molécule phytosanitaire est probablement le facteur le plus important vis-à-vis de son adsorption et le pH du système est également déterminant puisqu'il dirige la ionisation de la majorité des molécules organiques. L'adsorption sera donc différente selon que le composé se comporte comme un acide (donneur de proton à pH élevé, ex : 2,4-D, Dicamba) ; comme une base (receveur de proton, ex : s-triazines) ; ou comme un composé neutre (ex : thiocarbamates, phenylamides, phenylurées).

La solubilité dans l'eau du composé. Le degré de corrélation solubilité-adsorption varie d'une molécule active à l'autre (corrélation positive, négative ou aucune corrélation), (Khan (1978).

Le Koc est le coefficient de partage carbone organique / eau. Relativement indépendant de la nature du sol, il indique la mobilité des substances et permet leur comparaison. Un Koc élevé traduit un fort pouvoir d'adsorption et donc une faible mobilité.

Le DT50 ou demi-vie de la molécule dans le sol, correspond à la période nécessaire à la dégradation de la moitié du produit appliqué. Elle traduit la persistance du produit et est un bon indicateur de l'évolution de sa concentration sous l'effet des processus de dégradation ou de dissipation.

Les herbicides désherbants du maïs sont classés en trois groupes suivant leur risque potentiel pour l'écosystème. Ce classement est établi à partir de la dose d'application, la DT50, et le Koc (tableau I.2). En fonction des risques, des recommandations d'usage sur les zones d'application sont alors exprimées.

Tableau I.2: Groupes d'herbicides désherbants du maïs en fonction de leur risque pour l'environnement. Chambre d'Agriculture de Bretagne, 1999.

	Groupe 1 <i>risque faible</i>	Groupe 2 <i>risque limité dans le</i> <i>temps</i>	Groupe 3 <i>risque élevé</i>
Dose.ha⁻¹	< 500 g	> 500 g	> 500 g
	ou	et	et
DT50	< 8 jours	8 à 30 jours	> 30 jours
	ou	et	et
Koc (cm³.L⁻¹)	> 1000	< 1000	< 1000
Exemples	Bromoxynil- octanoate, Diméthinamid, Rimsulfuron, Nicosulfuron, Sulcotrione	2,4-D, Alachlore, Bentazone, Bromoxynil-phénol, Dicamba	Atrazine, Linuron, Métolachlore, Simazine, Terbutrine

Les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol sont des facteurs déterminants la dynamique des molécules. La texture et la structure du sol correspondent respectivement aux proportions de limon, d'argile et de sable et à l'agencement des constituants du sol (structure grumeleuse, compacte). La teneur en matière organique favorise l'agrégation des particules entre elles et assure ainsi la stabilité structurale des sols (Auzet, 1987 in Simon,

1995). Cette influence est d'autant plus importante que le taux d'argile est faible. L'état de surface du sol détermine la capacité d'infiltration de l'eau dans le sol et influence ainsi le ruissellement. Les organismes du sol, micro-organismes, végétaux et invertébrés agissent sur les propriétés physico-chimiques du sol (structure, porosité...) et assurent pour une large part les transformations bio-géochimiques des molécules circulant dans le sol.

Les caractéristiques topographiques et géographiques de site sont également à considérer dans une approche des risques. La pente qui influence la répartition de l'érosion. Le couvert végétal de la zone d'application peut constituer une protection vis-à-vis des précipitations. Les cours d'eau ou les zones humides (rétention des molécules dans les eaux de ruissellement) présents sur la zone d'application amplifient les risques de contamination. La localisation géographique qui correspond à un type de climat et donc de précipitations, à des types de sols et à un panel de micro-organismes est un facteur qu'il faut également considérer.

1.2.3 Devenir de l'atrazine : principaux processus connus

L'atrazine (2-chloro-4éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) est un herbicide de la famille des triazines (figure 1.4).

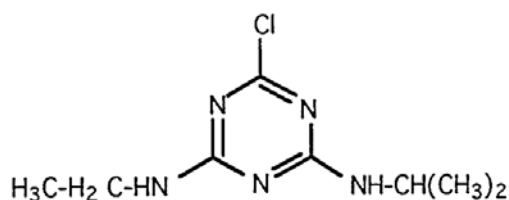


Figure 1.4 Schéma de la molécule d'atrazine

Il est utilisé en agriculture, principalement comme désherbant du maïs ou du sorgho et, plus modestement, en arboriculture. L'atrazine est facile d'emploi, efficace (efficacité de 2 à 6 mois dans le sol) et d'un faible coût. Sa consommation importante a atteint 5000 tonnes annuelles en France, depuis les années 60, jusqu'aux restrictions d'usage dès 1997 et jusqu'à son interdiction récente en 2003. Cet herbicide qui agit sur la cible au stade plantule, est absorbé par les racines et circule en suivant le courant de transpiration jusqu'aux organes transpirants, les feuilles. La photosynthèse est inhibée par fixation de la molécule sur une protéine du photosystème II (protéine D1), empêchant ainsi la transformation de l'énergie lumineuse en énergie électrochimique. Elle agit en effet par blocage du transfert électronique chloroplastique photodépendant qui se produit lors de la phase de réduction photochimique conduisant à la

formation massive d'un cofacteur de forme réduite : le NADPH (Tasli, 1995). La réussite du traitement à l'atrazine est liée au comportement de la matière active dans les premiers centimètres du sol *i. e.* à son **adsorption** et sa **dégradation**. L'adsorption de la molécule xénobiotique sur les constituants du sol i) réduit son efficacité (toxicité) envers l'organisme cible, ii) diminue sa **biodisponibilité** à la dégradation notamment à la minéralisation microbienne, iii) l'immobilise davantage réduisant ainsi son transfert et sa lixiviation (Berry et Boyd, 1985 ; Calderbank, 1989 ; Bolag, 1992 ; Dec et Bollag, 1997).

I.2.3.a Adsorption et rétention de l'atrazine

✓ Les interactions entre le sol et les pesticides

L'adsorption est probablement le mode d'interaction le plus important entre le sol et les pesticides et contrôle la concentration des pesticides dans la phase liquide du sol. Les interactions varient de la réversibilité à la totale irréversibilité (Gevao *et al.*, 2000). Le degré d'adsorption dépend des propriétés du sol et du composé : taille, forme, configuration, structure moléculaire, fonctions chimiques, solubilité, polarité, polarité potentielle et distribution de charges lors d'interaction, et nature acido-basique de la molécule) (Bailey et White, 1970 ; Senesi, 1992 ; Pignatello et Xing, 1996).

L'adsorption des pesticides sur les substances humiques du sol met en jeu des liaisons ioniques, hydrogènes et covalentes, des transferts de charge ou des mécanismes d'échange d'électrons, les forces de Van Der Waals, l'échange de ligand et les liaisons hydrophobes (Khan, 1978 ; Gevao *et al.*, 2000). Tous les mécanismes n'interviennent pas simultanément mais certains peuvent interagir. La formation de résidus liés n'est pas équivalente à une adsorption forte des composés puisque ces processus sont réversibles via des techniques d'extraction (Gevao *et al.*, 2000).

✓ Le concept de résidus liés ou résidus non extractibles et de biodisponibilité

L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) a défini le concept de **résidus liés** ou **résidus non extractibles** dans le sol ou les plantes (Kearney, 1982 ; Roberts *et al.*, 1984 ; Führ, 1987). Ce sont des produits chimiques (ingrédients actifs, métabolites ou fragments de molécules) provenant de pesticides utilisés selon l'usage conseillé en agriculture et qui ne sont pas extractibles par les méthodes ne changeant pas significativement la nature chimique de ces résidus. Ces résidus excluent ceux recyclés par voies métaboliques et conduisant à des produits présents naturellement. Cette définition a été modifiée par Calderbank (1989) qui introduit la notion de **biodisponibilité** : « ...Le point important n'est pas tant comment le résidu est défini mais la question de sa disponibilité biologique ». Une modification de la définition a ensuite été suggérée pour inclure une référence à la structure de la matrice par Führ *et al.* (1998) : « les résidus liés représentent les composés dans le sol, les plantes ou animaux qui persistent dans

la matrice, après extractions, sous la forme de la substance ou de métabolite(s). La méthode d'extraction ne doit pas altérer les composés eux-mêmes ou la structure de la matrice. La nature des liaisons peut-être clarifiée en partie par des méthodes d'extractions altérant partiellement la matrice, et par des techniques d'analyses sophistiquées. Par exemple les liaisons covalentes ioniques, les liaisons d'adsorption ou le piégeage ont été identifiées de cette manière. En général la formation de résidus liés réduit significativement la **bioaccessibilité** et la **biodisponibilité**. ». La biodisponibilité et la bioaccessibilité correspondent respectivement à la disponibilité et l'accessibilité des molécules pour les organismes vivants (absorption par la plante ou la faune du sol, dégradation par les microorganismes ...).

Les processus d'adsorption et de dégradation de l'atrazine sont en interaction dans la mesure où plus grande est l'adsorption par la matrice sol (Bellin *et al.*, 1990 ; Martinez-Inigo et Almendros, 1992 ; Guo *et al.*, 1993) plus faible est la disponibilité de la molécule à une dégradation microbienne (Doyle *et al.*, 1978 ; Guerin et Boyd, 1992 ; Smith *et al.*, 1992 ; Barriuso *et al.*, 1994 ; Barriuso *et al.*, 1997).

✓ Les déterminants de la formation des résidus liés

La formation de résidus non extractibles est déterminée par plusieurs facteurs : la concentration initiale dans le sol, la température et surtout le temps d'exposition (Scheunert, 1992). Le temps d'exposition ou temps de contact comme déterminant majeur dans la formation de résidus non extractibles est également cité par Best et Weber (1974) ; Khan et Hamilton (1980) ; Khan et Ivarson (1981). Le temps de contact de la molécule avec la matrice entraîne soit la formation de liaisons plus fortes, soit le piégeage (ou occlusion physique) du composé dans la matière organique ou la matrice minérale (Gevao *et al.*, 2000). Dans le sol à l'échelle moléculaire, des processus passifs se produisent également avec l'augmentation du temps d'exposition des molécules chimiques : adsorption sur les particules de sol (Ball et Roberts, 1991a ; Fu *et al.*, 1994 ; Burgos *et al.*, 1996) ; diffusion dans des zones spatialement protégées comme les micropores (Ball et Roberts, 1991b ; Beck et Jones, 1995 ; Burgos *et al.*, 1996 ; Pignatello et Xing, 1996) et piégeage dans la matière organique (Brusseau *et al.*, 1991a, b ; Fu *et al.*, 1994). La diffusion dans des microsites protégés de la matrice de sol combinée à l'adsorption relèvent du vieillissement et conduisent à la séquestration des molécules (Alexander, 1995), laquelle est considérée comme une adsorption lente (Pignatello et Xing, 1996). A l'échelle de la parcelle, des facteurs supplémentaires affectent la formation de résidus liés : les applications répétées, les amendements organiques et inorganiques et le mode d'application sur le sol (Gevao, 2000). La formation de résidus non extractibles est augmentée quand le pesticide est uniformément incorporé au sol par comparaison avec une application en surface (Racke et Lichtenstein, 1985).

✓ Rôle de la composition des sols

La composition minérale, le contenu et la nature de la matière organique ont des rôles clefs sur le comportement des pesticides dans le sol (Senesi et Miano, 1989 ; Barriuso *et al.*, 1992).

- **Influence de la matière organique**

La matière organique des sols a un rôle prédominant dans l'adsorption des molécules hydrophobes. L'adsorption de l'atrazine est reconnue pour augmenter avec la quantité de matière organique contenue dans le sol (Khan, 1978 ; Walker et Crawford, 1968 dans Huang *et al.*, 1995 ; Barriuso et Calvet, 1992). Ainsi, un apport de matières organiques exogènes sous forme de compost sur un sol limono-argileux, favorise l'adsorption des herbicides atrazine et sulcotrione (Barriuso *et al.*, 1996).

L'atrazine faiblement basique s'associe facilement aux protons H^+ pour former un composé protoné, et se comporte alors comme un cation organique (Khan, 1978) qui peut être adsorbé sur des sites chargés négativement de la matière organique (Weber *et al.*, 1969, 1974). L'adsorption des pesticides basiques par la matière organique du sol est dépendante du pH : elle décroît pour des valeurs élevées de pH (Doherty et Warren, 1969 ; Weber *et al.*, 1969 ; Lowder et Weber, 1972; Khan, 1978).

- **Influence du complexe argilo-humique**

Khan (1978) souligne la nécessité de prendre également en compte les complexes matière organique – argiles dans l'adsorption des pesticides. Des études ont en effet démontré que l'atrazine était très adsorbée sur des smectites de référence (Laird *et al.*, 1992 in Stehouwer *et al.* 1994) et que l'addition de montmorillonite favorisait son adsorption (Moyer *et al.*, 1972). Cependant Hance (1969a) suggère que dans le sol, l'argile et la matière organique sont associés de telle manière que peu de surface minérale de l'argile est accessible aux molécules herbicides. Ainsi l'auteur souligne que la contribution des fractions argileuses à l'adsorption dans les sols est inférieure à ce que les études avec des argiles seules peuvent démontrer. A l'inverse d'après Mortland (1968), les composés de la matière organique du sol, en interaction avec l'argile, peuvent faciliter et stabiliser l'adsorption des pesticides par rapport à un système argileux inorganique.

La mobilité des **métabolites de dégradation** est tout aussi importante puisqu'elle détermine leur devenir et leur persistance dans le sol. Ainsi, Schiavon (1988) a observé sur un sol brun lessivé, dans des lysimètres (H : 60 cm), que les trois métabolites de dégradation dealkylés de l'atrazine (DEA, DIA et DEDIA) étaient plus mobiles que la molécule mère à l'inverse du métabolite dechloré (OH-A) moins mobile.

I.2.3.b. Dégradation et minéralisation

Les dégradations biotiques et abiotiques des pesticides conduisent à l'**atténuation naturelle** des molécules dans les sols.

✓ Dégradation abiotique

La frontière entre les altérations biotiques et abiotiques est difficile à définir mais certains auteurs définissent comme abiotiques, toutes les réactions initiées par des composés chimiques réactifs, des fonctions moléculaires du sol ou catalysées par des substances comme les surfaces organiques ou minérales (Scheunert, 1992). La photodécomposition est un processus de dégradation purement abiotique qui n'est possible que lorsque la molécule est capable d'absorber le rayonnement UV ($\lambda > 290\text{nm}$) (Mansour *et al.*, 1989 In Scheunert, 1992).

✓ Dégradation biotique

Les réactions biotiques correspondent aux transformations se produisant dans les organismes vivants du sol ou catalysées par des enzymes à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Scheunert, 1992). On distingue les oxydations, les réductions et les hydrolyses. Parmi les altérations biotiques deux situations se différencient : dans le premier cas, le pesticide est dégradé en produits inorganiques de faible poids moléculaire (CO_2 , H_2O , $\text{Cl}^- \dots$), cette dégradation totale s'appelle la **minéralisation**. Dans le deuxième cas, le pesticide est partiellement dégradé en molécules organiques de faible poids moléculaire. Lorsque la dégradation est accompagnée d'une augmentation de biomasse des organismes qui obtiennent *via* ces réactions l'énergie et le carbone pour la synthèse biologique, elle correspond au **métabolisme**. En absence de croissance, la dégradation partielle est appelée **co-métabolisme** ; les microorganismes provoquent la transformation chimique des pesticides en utilisant une autre source de C et d'énergie pour leur croissance (Scheunert, 1992 ; Soulas 1999).

Les produits de transformation biotique des pesticides ou **métabolites**, principalement issus de processus co-métaboliques sont parfois des intermédiaires dans la séquence de minéralisation. Ainsi la minéralisation et la formation de métabolites de dégradation sont liés alors que ces processus sont opposés : en effet alors que la minéralisation est le seul processus conduisant à l'élimination totale d'un composé xénobiotique dans l'environnement, la formation de métabolites permet l'apparition de nouveaux xénobiotiques qui suivant leur plus ou moins grande toxicité par rapport à la molécule mère s'inscrivent respectivement dans les processus d'activation ou de détoxification des sols (Scheunert, 1992).

I.2.3.c. La dégradation de l'atrazine et les concepts attenants

La dégradation de l'atrazine est d'origine abiotique et biotique mais la dégradation microbienne est depuis longtemps considérée comme la principale voie de dissipation de l'atrazine dans les sols (Kaufman et Kearney, 1970). Une grande variété de microorganismes est capable de dégrader partiellement l'atrazine par *N*-dealkylation (figure I.5, voie 1 et 2), (Yassir *et al.*, 1988 pour les bactéries et champignons ; Kaufman et Blake, 1970 pour les champignons) ou déhalogénéation (figure I.5, voie 3) (Bouquard *et al.*, 1997 pour les bactéries) ou les deux voies (Mougin *et al.*, 1994 pour les champignons ; Behki et Khan, 1986 pour les bactéries). La voie de dégradation microbienne de l'atrazine classiquement décrite, conduit à la formation de composés déalkylés (DEA et DIA). Levanon (1993) souligne les interventions conjointes et successives de bactéries et de champignons pour dégrader l'atrazine dans les sols. L'atténuation naturelle de l'atrazine est réalisée par le consortium microbien présent dans les sols. En effet, Mandelbaum *et al.* (1993) ont observé que plus de 200 cultures bactériennes isolées de sols exposés au préalable à l'atrazine, ne pouvaient utiliser l'atrazine comme source d'azote. Cependant, le mélange des cultures isolées restaure l'activité de dégradation de l'atrazine.

Un schéma (figure I.5) a été proposé pour représenter la dégradation de l'atrazine et des noyaux des *s*-triazines. L'acide cyanurique (2,4,6-trihydroxy-1,3,5-triazine) y est le composé intermédiaire final soumis à une hydrolyse du noyau pour former du CO₂ et du NH₄⁺ via une hydrolyse du biurate et de l'urée (Cook *et al.*, 1985 ; Cook, 1987). La dégradation du noyau se produirait après hydroxylation de la molécule (Kaufman et Kearney, 1970).

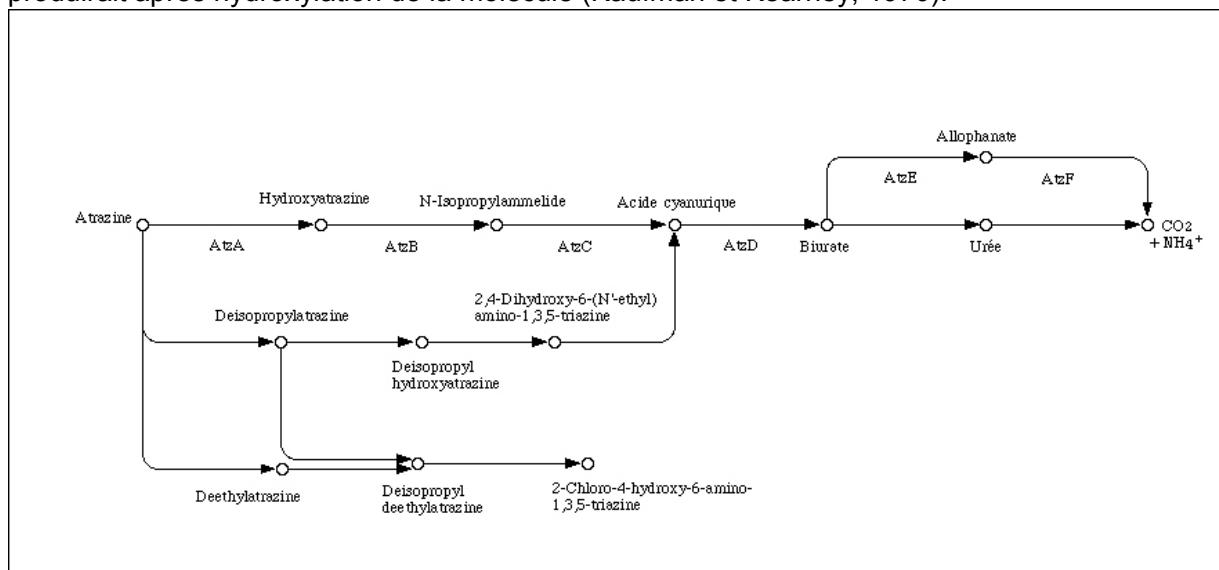


Figure I.5 : Voies de dégradation de l'atrazine : voie 1 : deethyl-atrazine, voie 2 : deisopropyl-atrazine et voie 3 : hydroxyatrazine. Les gènes codant pour les enzymes dégradant l'atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP sont indiqués sur le schéma (AtzA,B,C,D,E,F).

✓ Le concept de dégradation accélérée

Récemment la minéralisation complète et rapide de l'atrazine en CO₂ a été rapportée pour un consortium bactérien (Gschwind, 1992 ; Mandelbaum *et al.*, 1993a; Assaf et Turco, 1994), pour des isolats bactériens purs comme les souches *Pseudomonas* (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Mandelbaum *et al.*, 1995), *Agrobacterium radiobacter J14a* (Struthers *et al.*, 1998) et la bactérie M91-3 (Radosevich *et al.*, 1995). De même une minéralisation rapide de l'atrazine a pu être observée pour des bactéries isolées inoculées en sols stériles à partir des souches *Pseudomonas* (Wenk *et al.*, 1998) ; M31-3 (Radosevich *et al.*, 1997) ou *Streptomyces* (Fadullon *et al.*, 1998) ou *Nocardioïdes* sp. (Topp *et al.*, 2000) ou encore inoculées en sols non stériles pour la bactérie *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995 ; Newcombe et Crowley 1999) ou le champignon *Phanerochaete chrysosporium* (Entry *et al.*, 1995) ainsi que pour des populations présentes dans les sols (Topp *et al.*, 1995 ; Barrisuo et Houot, 1996).

Certains micro-organismes se développent en utilisant le carbone du noyau de l'atrazine comme seule source de carbone (Bekhi et Khan, 1986 ; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Radosevich *et al.*, 1995) et d'autres réalisent leur croissance par utilisation de l'azote du noyau (Cook et Hütter, 1981 ; Mandelbaum *et al.*, 1993 ; Radosevich *et al.*, 1995) mais les deux processus ne sont pas exclusifs.

Pour des molécules de la même famille, la dégradation accélérée a été observée pour la simazine (une chloro-s-triazine) mais pas pour la terbutryn (methyl-s-triazine). La dégradation accélérée serait donc dépendante de la substitution du chlore par un groupement hydroxyl (-OH) sur la molécule (Barriuso et Houot, 1996). Mandelbaum *et al.* (1993b) et de Souza *et al.* (1995) ont observé que l'hydroxylation (déchlorination) était la première étape de la dégradation de l'atrazine et qu'elle était d'origine microbienne. Cette première étape était auparavant connue pour être catalysée chimiquement (Skipper *et al.*, 1967), se produisant en conditions acides et impliquant des fonctions acides des substances humiques (Khan, 1978) (voie de dégradation de l'atrazine n°3 sur figure I.4) Apparemment, le clivage du noyau se produirait seulement après hydroxylation (Kaufman et Kearney, 1970). L'hydroxylation est effectuée par la souche *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995) pour laquelle les gènes *AtzA*, *B*, *C*, *D*, *E* et *F* issus du plasmide transmissible pADP1 (de Souza *et al.*, 1998) qui codent pour des enzymes impliquées dans la minéralisation de l'atrazine ont été séquencés et caractérisés (figure I.4) (Boundy-Mills *et al.*, 1997 ; de Souza *et al.*, 1995 ; de Souza *et al.*, 1996 ; Mandelbaum *et al.*, 1995 ; Martinez *et al.*, 2001 ; Sadowsky *et al.*, 1998).

✓ Adaptation des sols à la dégradation accélérée de l'atrazine

L'historique de cultures des sols agricoles et par conséquent **l'historique du traitement phytosanitaire** est un facteur important dans la réponse des sols à la dégradation de l'atrazine (Barriuso et Houot, 1996) comme démontré pour d'autres pesticides. Barriuso et Houot (1996) ont en effet observé que 75 % de l'atrazine appliquée étaient minéralisés en 64 jours par des

sols en monoculture de maïs (pendant 34, 16 et 5 ans), 50 % en 64 jours pour un sol en rotation blé-maïs et moins de 4 % pour un sol jamais cultivé en maïs. Cette dégradation accélérée correspond à une adaptation du sol à la minéralisation de l'herbicide. Les auteurs l'expliquent par un développement de la microflore capable de dégrader l'atrazine et il serait liée aux applications répétées d'atrazine, résultat confirmé par d'autres études (Pussemier *et al.*, 1997 ; Vanderheyden *et al.*, 1997 ; Yassir *et al.*, 1999 ; Piutti *et al.*, 2002).

Le **pH du sol** est déterminant dans le processus de dégradation accélérée de l'atrazine. Pour des sols acides ($\text{pH} < 6,0$), la dégradation est lente et ne dépasse pas 25 % de l'atrazine initiale appliquée en 35 jours même après des applications successives d'atrazine. Pour un pH supérieur à 6,5 une minéralisation accélérée a été observée atteignant 50 à 80 % de minéralisation de l'atrazine appliquée. Pour les pH intermédiaires l'augmentation de la minéralisation de l'atrazine est progressive avec le pH (Houot *et al.*, 2000). La dégradation biologique de l'atrazine est directement reliée au pH du sol alors que sa dégradation chimique était connue pour être inversement proportionnelle au pH (Armstrong et Chester, 1967 ; Harris, 1967 ; Skipper *et al.*, 1967 ; Skipper et Volk, 1972 ; Best *et al.*, 1975 ; Kells *et al.*, 1980).

Deux processus en compétition sont proposés par Barriuso et Houot (1996) : i) une dissipation rapide par clivage du noyau d'atrazine et une minéralisation pour les sols où l'atrazine est appliquée tous les ans, ii) une dissipation plus lente et progressive par formation de résidus liés ce qui semble être le comportement observé dans la majorité des sols.

✓ La biorémédiation des sols

La dégradation rapide de l'atrazine et l'isolation de bactéries impliquées dans ces processus introduit la notion de **biorémédiation** des sols contaminés. La biorémédiation s'applique aux sols contaminés qui montrent une absence ou une insuffisance de cellules actives, ou encore une insuffisance d'activité métabolique de ces enzymes cellulaires (Soulas, 1999). La **biostimulation** correspond à la stimulation de l'activité dégradante des microorganismes naturellement présents dans les sols alors que la **bioaugmentation** correspond à l'inoculation dans le sol de souches préalablement sélectionnées (Soulas, 1999).

I.3 Bioturbation des sols par la macrofaune lombricienne

Les lombriciens (annélides, oligochètes) sont présents en grandes quantités dans les sols tempérés, en prairies (600-700 ind.m⁻² pour une biomasse supérieure à 1000 kg.ha⁻¹) comme dans les agrosystèmes (300-400 ind.m⁻² pour une biomasse de 500 kg.ha⁻¹) (Binet, 1993). Les activités lombriciennes d'ordre mécanique ou métabolique, conduisent à des transformations de la matière organique, au recyclage des nutriments et au transfert de matière et d'énergie entre les différents horizons. Leur importance dans le brassage des horizons du sol a été soulignée par Darwin dès 1881, dans son ouvrage « The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations on their habits ».

En affectant les propriétés physiques et chimiques du sol ils modifient le biotope des communautés microbiennes. Ainsi les lombriciens ont été qualifiés d'« **organismes ingénieurs** » des sols (Stork et Eggleton, 1992 ; Lavelle, 1997) dans la mesure où ils influencent la diversité et l'activité d'organismes appartenant à des groupes fonctionnels subordonnés (transformateurs de litière, microprédateurs et microorganismes) et qu'ils régulent les transformations de nutriments (Lavelle *et al.*, 1997).

I.3.1 Diversité lombricienne et diversité des modes d'action

La majorité des vers de terre rencontrés en France appartiennent à la famille des Lumbricidae. Cette famille est de loin la plus importante en Europe (Bouché, 1972). En France, il existe 97 espèces, 49 sous-espèces et 33 variétés, soit un total de 180 taxons différents (Bouché, 1972).

L'action des lombriciens se situe à différentes échelles de temps et d'espace et varie selon l'espèce, leur taille ou leur mode de vie. Bouché (1977) classe les lombriciens en trois catégories écologiques selon des critères morphologiques et comportementaux : les épigés, les anéciques et les endogés.

Les **épigés** (Bouché, 1977 ; Lee, 1985) sont de petite taille (10 à 30 mm en général) et vivent généralement dans la litière ingérant peu de matière minérale. Plusieurs groupes se distinguent en fonction de leur régime alimentaire : les straminicoles (litière), les corticoles (écorce et tronc d'arbre en décomposition, composts et fumier), les détritiphages (déchets organiques divers) et

les coprophages (déjections de mammifères). Ces espèces sont localisées en surface et sont donc particulièrement sensibles à la prédation, aux variations climatiques et aux facteurs anthropiques tels que le labour des horizons de surface et l'usage de phytosanitaires. Les épigés sont rarement présents en sols cultivés. Des introductions intempestives sont parfois réalisés lors d'épandages de fertilisants organiques comme le fumier et le lisier (Binet, 1993).

Les **anéciques** (Bouché, 1977) sont des individus de taille moyenne à géante, dans le cas des espèces méditerranéennes, (10 à 110 cm) vivant dans des galeries verticales à subverticales plus ou moins ramifiées et s'ouvrant en surface. Au cours de l'ingestion du sol et de l'enfouissement de la matière organique, ils assurent un mélange intime de la matière organique et de la fraction minérale des différents horizons du sol. Ces espèces, localisées sur toute la hauteur du profil, disposent d'une forte musculature leur permettant de s'adapter à des compacités de sol relativement élevées et de résister aux pressions anthropiques connues en sols cultivés.

Les **endogés** (Bouché, 1977) sont de taille variable (1 à 20 cm) et creusent des galeries d'orientation quelconque. Ces vers se nourrissent de la matière organique incorporée dans la matrice du sol et se déplacent donc beaucoup pour satisfaire leurs besoins alimentaires. Lavelle (1981) précise cette classification en fonction de la richesse en matière organique du milieu où évolue le ver. Il distingue les oligohumiques, les polyhumiques et les mésohumiques (*i. e.* vivant dans des milieux respectivement pauvres, riches et moyennement riches en matière organique). Des espèces à mode d'action intermédiaire existent entre ces trois catégories. Les deux espèces concernées par cette étude ont un comportement épianécique pour *Lumbricus terrestris* et endogé voire épi-endogé pour *Aporrectodea caliginosa* (figure I.6).

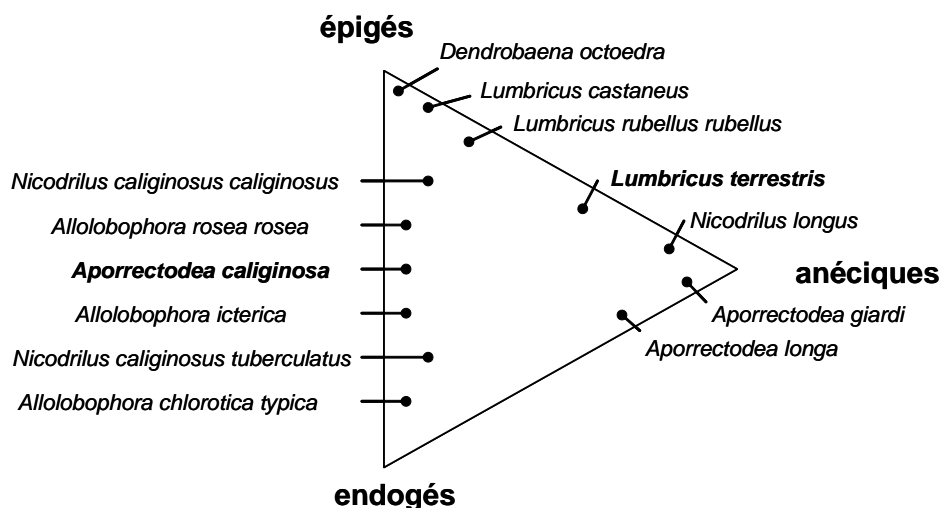


Figure I.6 Diagramme situant quelques espèces communes dans le système tripolaire des catégories écologiques (d'après Bouché, 1977).

I.3.2 Les lombriciens, organismes ingénieurs des sols

Les activités mécaniques des lombriciens comprennent i) l'élaboration d'un réseau de galeries où ils se déplacent et ii) l'excrétion de déjections dans les galeries (fèces) ou en surface (turricules). La sécrétion de mucus épidermique et l'excrétion d'urine dans le sol résultent d'activités métaboliques. D'autres activités métaboliques se déroulent également dans le tractus digestif : activités enzymatiques, ajout de mucus intestinal, régulation du flux de calcium.

La **drilosphère** est la zone d'influence des lombriciens sur le fonctionnement des sols. Elle comprend toutes les structures physiques dépendantes des lombriciens (le contenu du tube digestif, les turricules et les galeries des lombriciens) ainsi que les communautés d'invertébrés et de micro-organismes qui y sont présentes. Il s'agit là d'un système biologique de régulation dans le sol qui en termes d'interactions biotiques présente des analogies avec la rhizosphère (Beare *et al.*, 1995 ; Lavelle et Spain, 2001). La structure et l'importance relative de la drilosphère sont déterminées par le climat, les paramètres du sol et la qualité des apports organiques (Lavelle *et al.*, 1998).

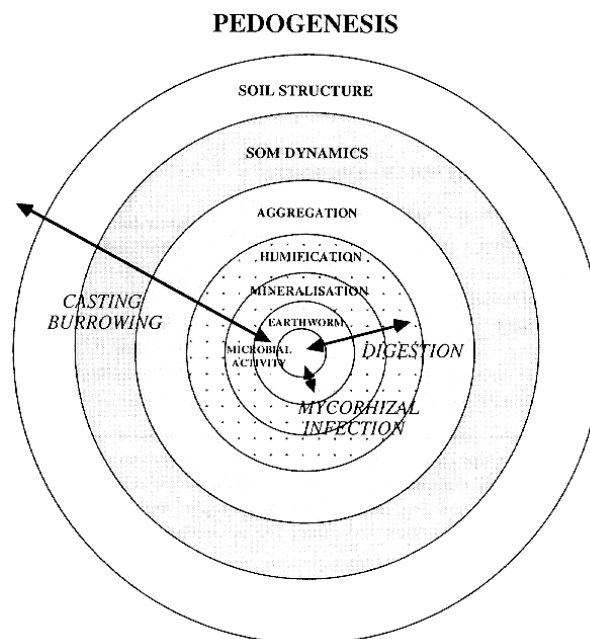


Figure I.7 : Impacts des activités lombriciennes sur le fonctionnement du sol à différentes échelles spatiales et temporelles (Lavelle *et al.*, 1998).

L'effet des lombriciens sur le fonctionnement des sols dépend des interactions avec les facteurs biotiques et abiotiques, à différentes échelles spatiales et temporelles (Lavelle *et al.*, 1998 ; figure I.7). Ces effets affecteront des structures de tailles différentes et persisteront pendant des durées variables. Les structures physiques créées par les lombriciens en interaction avec les

composants du sol, persisteront plus longtemps que le flush d'activité des microorganismes dans le sol excrété (Lavelle *et al.*, 1998). En raison de leurs particularités physico-chimiques, les biostructures (galeries et turricules) ou microsites d'origine biotique, participent à la création d'une hétérogénéité dans le sol.

I.3.2.a Hétérogénéité des structures créées par les lombriciens

Selon la compacité du sol, les vers construiront leurs galeries en se fauillant par compaction latérale ou en ingérant et excréant le sol au fur et à mesure de leur progression.

✓ Les galeries

Selon la catégorie écologique des lombriciens le réseau de galeries sera différent (étendue, orientation, diamètre...). Le nombre de galeries dans un sol dépend de l'abondance lombricienne mais peut atteindre plusieurs centaines par m² (Lee, 1985). Dans les sites avec des communautés lombriciennes importantes, le volume des galeries peut constituer une part importante des pores du sol et fournir ainsi une voie de passage pour l'air et l'eau dans le sol (Lee, 1985, Tomlin *et al.*, 1995). Par exemple dans un pâturage dominé par des espèces anéciques, Kretzschmar (1978) cite un volume de 5 L et une aire d'ouverture de galeries de 4,9 m² par m² de surface de sol.

Au laboratoire, le réseau de galeries créé par les espèces *Lumbricus terrestris*, et *Aporectodea caliginosa* en microcosmes de sol (hauteur 27 cm), représente respectivement 14 cm³ et 22 cm³ par gramme de ver introduit, pour 246 jours (Jégou, 1998). Les galeries de *L. terrestris* sont continues et longues de plus de 10 cm (Jégou, 1998). Pour *Aporectodea caliginosa* la longueur du réseau de galeries est inférieur à 25 cm (Mc Kenzie et Dexter, 1993) avec une longueur moyenne de 3 à 4 cm (Mc Kenzie et Dexter, 1993, Jégou, 1998).

Lumbricus terrestris creuse une ou deux galeries continues semi-permanentes avec une ouverture débouchant à la surface (Schrader *et al.*, 1995). Au champ ses galeries peuvent atteindre 1 m de profondeur (Lee, 1985). Le ver y vit en se déplaçant vers la surface pour y rechercher sa nourriture (feuilles mortes, débris organiques) qu'il incorpore dans la galerie. Les galeries et les parois des galeries de *L. terrestris* sont des structures très stables. Des observations en forêt suggèrent que la durée de vie des galeries excède celle de l'individu (Tiunov et Kuznetsova, 2000), celles-ci pouvant être habitée pendant plus de 6 ans (données non publiées dans Tiunov et Scheu, 1999). L'effet de cette espèce via la biostructure galerie perdure ainsi plus longtemps que l'effet de l'individu.

Aporrectodea caliginosa construit un réseau plus ramifié et à orientation quelconque à la recherche de fines particules organiques de la matrice de sol. Contrairement à *L. terrestris* peu de galeries sont observées dans les horizons profonds et leur position est dépendante de la compacité du sol (Schrader *et al.*, 1995). Les teneurs en matière organique étant faibles en agrosystèmes, *A. caliginosa* tend à se concentrer au niveau de la rhizosphère des plantes cultivées (Binet *et al.*, 1997) et fréquente davantage l'horizon de surface pour bénéficier des apports de litière (épi-endogé).

✓ Les turricules

Le sol est ingéré puis excrété par les lombriciens. Les turricules correspondent au sol excrété à la surface du sol et les fèces au sol excrété le long des parois de galeries ou dans les galeries.

Les turricules représentent 2 à 250 tonnes $\text{ha}^{-1} \text{an}^{-1}$ en sols tempérés, les valeurs moyennes en prairies étant 40 à 50 tonnes $\text{ha}^{-1} \text{an}^{-1}$, soit une épaisseur de sol de 3 à 4 mm (Lee, 1985). La production et l'abondance des turricules sont variables en fonction du milieu considéré (conditions climatiques, type de sol), du peuplement lombricien et du couvert végétal. En sol cultivé tempéré sous culture de maïs, sur la parcelle concernée par cette étude, Binet et Le Bayon (1999) ont évalué la production de turricules de 2,5 à 3,5 kg (poids sec). $\text{m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ pour 100 g de vers. m^{-2} . La durée de vie moyenne d'un turricule varie de 4 jours en période pluvieuse à 14 jours en période sèche. Les turricules plus âgés atteignent au moins deux mois. La pluie est le facteur prépondérant de dégradation des turricules. En effet la disparition des turricules est de 70 % au cours des pluies et de 20 % en période sèche. En période sèche, les turricules sont progressivement intégrés à la matrice du sol (Binet et Le Bayon, 1999).

Les lombriciens se nourrissent sélectivement de sol enrichi en matière organique (Lee, 1985 ; Mulongoy et Bedoret, 1989 ; Zhang et Schrader, 1993 ; Doube *et al.*, 1994d). De nombreuses espèces et notamment *L. terrestris* et *A. caliginosa* concernées par cette étude, consomment préférentiellement un mélange de particules minérales fines et de matière organique que de la matière organique seule (Doube *et al.*, 1995).

Les champignons constituent une source importante de nourriture pour beaucoup de vers de terre (Dash *et al.*, 1979, 1986 ; Edwards et Fletcher 1988). Les lombriciens se nourrissent également de protozoaires (Pierce et Phillipps 1980), de bactéries (Schmidt 1994) même si le rôle de ces dernières dans le régime alimentaire des lombriciens est moins connu et d'algues (Doube et Brown 1998).

Les conditions dans le tube digestif (enzymes diverses, mucus intestinal, CaCO_3 , substances bactéricides) influencent la capacité des organismes ingérés à survivre à l'ingestion (Brown 1995). Les organismes ayant survécu (surtout des spores de champignons et de protozoaires ainsi que des bactéries résistantes) constitueront l'inoculum qui colonisera le turricule par la

suite et orientera les processus microbiens (Dash *et al.*, 1986 ; Spiers *et al.*, 1986 ; Brown 1995).

I.3.2.b Hétérogénéité des processus liés à l'action des lombriciens

La diversité des comportements fouisseur et alimentaire des lombriciens conduit à une grande variabilité dans la composition des galeries et des turricules qui possèdent alors des caractéristiques significativement différentes du sol initial non ingéré. Dans les galeries et les turricules des processus physico-chimiques et biologiques interviennent à des échelles de temps différentes. Ces biostructures contribuent à une structuration spatiale des communautés de micro-organismes et à une hétérogénéité des processus biogéochimiques dans le sol.

✓ Les galeries

- **Hétérogénéité physique liée aux galeries**

Les vers de terre contribuent à la diversité de la taille de la **macroporosité** (Binet, 1997). La taille des pores des galeries est comprise entre 40 et 160 mm² pour les espèces *L. terrestris*, *A. giardi* et *A. caliginosa* (Jégou, 1998). Jégou (1998) a montré que l'orientation des macropores diffère avec l'espèce.

Des études au champ et au laboratoire (Joschko *et al.*, 1989 ; Kretzschmar, 1988 ; Kretzschmar, 1989 ; Edwards *et al.*, 1990 ; Joschko *et al.*, 1992) ont montré que la présence de galeries a une influence sur la circulation de l'eau, des solutés et des gaz dans le sol. L'efficacité des ces transports dépend du diamètre des pores (Mc Gredie et Parker, 1991 ; Roth et Joschko, 1991), mais aussi de la densité des galeries (Schrader *et al.*, 1995), de la longueur et la continuité des galeries (Kretzschmar, 1988 ; Schrader *et al.*, 1995) des connections entre les galeries, de la surface du sol et des micropores du sol environnant (West *et al.*, 1991 ; Urbanek et Dolezal, 1992). Des expérimentations en microcosmes au laboratoire ont montré que la conductivité hydraulique d'un sol était multipliée par 8 à 9 en présence de *L. terrestris* et dans une moindre mesure avec *A. caliginosa* (Joschko *et al.*, 1989, 1992). Des études au champ ont confirmé ces résultats avec des galeries de *L. terrestris* (Edwards *et al.*, 1989, 1992).

Une diminution de la porosité a pu être observée au niveau des parois de galeries des espèces *L. terrestris* et *A. caliginosa* (Joschko *et al.*, 1991 ; Binet et Curmi, 1992, Jégou, 1998). Pour *L. terrestris*, elle résulte de la formation de cutanes (tassement de déjections dans les galeries). Cette réduction de la porosité au niveau des parois de galeries est susceptible de modifier l'efficacité des galeries dans le transfert d'eau dans le sol (Elhers, 1975 ; West *et al.*, 1991 ; Urbanek et Dolezal, 1992).

- **Hétérogénéité des teneurs en nutriments**

Le rôle fouisseur actif des espèces anéciques favorise le transfert de composés dans les différents horizons de sol. L'incorporation de matière organique dans les parois a été démontrée pour *A. giardi* en microcosmes (Jégou *et al.*, 1998) et pour *L. terrestris* en forêt (Van Hoof, 1983).

Les parois de galeries sont tapissées de mucus sécrété et de déjections riches en nutriments excrétées aux cours de leur passages successifs (cutanes, Jégou, 1998) (Sims et Gerard, 1985 ; Binet et Curmi, 1992). Par rapport au sol environnant, les parois de galeries de *L. terrestris* sont plus riches en **carbone** organique (Binet, 1993 ; Flegel *et al.*, 1998) et en **azote** (Binet, 1993). Tiunov et Scheu (1999) quantifient cet enrichissement d'un facteur de 1,8 à 3,5 pour le carbone organique et de 1,3 à 2,2 pour l'azote total, avec *L. terrestris* en écosystèmes forestiers.

- **Structuration des communautés de micro-organismes et Hétérogénéité des activités métaboliques**

L'enrichissement en nutriments favorise la colonisation des galeries par les micro-organismes. La texture plus fine des cutanes (Ladd *et al.*, 1993, Zang et Schrader, 1993) précédemment citées en fait des microhabitats favorables aux micro-organismes les plus petits (bactéries) (Elliot et Coleman, 1988 ; Santruckova *et al.*, 1993).

Dans les parois de galeries, une augmentation de la biomasse microbienne et des changements dans la composition des communautés ont été observés par Tiunov et Dobrovolskaya (2002). Ainsi la biomasse microbienne s'accroît d'un facteur compris entre 2,3 et 4,7 dans les parois de galeries de *L. terrestris* par rapport au sol environnant, ce qui serait principalement lié à l'augmentation du volume bactérien (Tiunov et Scheu, 1999). Cette croissance microbienne se traduit par une augmentation de la respiration (Binet, 1993) d'un facteur de 3,7 à 9,1 (Tiunov et Scheu, 1999) en écosystèmes forestiers. La minéralisation de l'azote y est favorisée (Binet, 1993) et Parkin et Berry (1999) ont également mis en évidence de fortes activités de nitrification et dénitrification dans les galeries de *L. terrestris*.

✓ Les turricules

Les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des turricules fraîchement déposés en surface et dans les galeries varient selon les espèces, le sol et la végétation (Tomlin *et al.*, 1995).

- **Hétérogénéité structurale liée aux turricules**

A l'échelle du turricule, les lombriciens modifient la **texture** du sol. Des analyses de fractionnement granulométrique ont montré que les lombriciens ingèrent en priorité les particules fines du sol. Les turricules contiennent des proportions plus importantes d'argile et de limon que le sol environnant (Sharpley et Syers, 1976 ; Shipitalo et Protz, 1988). La taille des particules ingérées est fonction de celle du ver.

De même à l'échelle du turricule, les lombriciens modifient la **structure** du sol via le mélange intime entre les composés organiques et minéraux dans leur tube digestif. Lors du transit, de multiples contractions musculaires broient finement les constituants minéraux et organiques ingérées. La structure du sol est modifiée et des composés organiques et l'argile sont libérés, d'autres composés organiques peuvent alors être protégés par la formation du turricule et des nouveaux agrégats (Shipitalo et Protz 1988 ; Barois *et al.*, 1993).

Des observations ont montré que les lombriciens pouvaient accroître la stabilité des agrégats en renforçant les liaisons entre la matière organique et les argiles par l'ajout notamment de sucres et de polysaccharides au cours du transit intestinal (Bhandari *et al.*, 1967 ; Shipitalo et Protz, 1989).

La stabilité des agrégats formés dépend du degré d'humidité des turricules. Les argiles sont plus mobiles et la matière organique non protégée dans les turricules fraîchement émis. La minéralisation est potentiellement favorisée avant que le sol ne s'assèche et que la matière organique ne soit protégée dans les agrégats (Marinissen *et al.*, 1995). La stabilité des turricules déposés en surface augmente avec les cycles de réhumectations-séchages lors des événements pluvieux (Hindell *et al.*, 1997b). Avec le temps, la prolifération d'hyphes de champignons sur la surface des turricules peut également favoriser leur stabilisation (Parle, 1963b ; Marinissen et Dexter, 1990 ; Hindell *et al.*, 1997b). Avec l'âge des turricules, la stabilité des agrégats varie ainsi que l'accessibilité des composés organiques.

- **Hétérogénéité des teneurs en nutriments**

L'ajout de mucus au cours du transit intestinal constitue un apport en carbone pour les turricules mis en évidence notamment par une augmentation de 90 % de la respiration dans les turricules d'*A. caliginosa* sur une période d'un mois (Scheu, 1987).

Quelles que soient les catégories écologiques, les teneurs en **azote** total (Lunt et Jacobson, 1945 ; Parle, 1963b ; Tiwari *et al.*, 1989, Binet, 1993 ; Buck *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2003) et

en **carbone** organique (Tiwari *et al.*, 1989 ; Binet, 1993 ; Kang et Ojo, 1996 ; Buck *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2003) sont plus élevées dans les turricules que dans le sol non ingéré. Ces résultats traduisent une ingestion sélective par les lombriciens et suggèrent leur influence dans les cycles des nutriments dans les sols : sur la minéralisation et la disponibilité à court terme de l'azote (Didden *et al.*, 1994 ; Chapuis-Lardy *et al.*, 1998 ; Ablain, 2002) et de la matière organique (Blanchart *et al.*, 1990 ; Marinissen *et al.*, 1995).

- **Structuration des communautés de micro-organismes et hétérogénéité des activités métaboliques**

Parle (1963a) montre un enrichissement des turricules en bactéries et en actinomycètes pour *L. terrestris* et un développement d'hyphes de champignons à leur surface (Parle, 1963b). Des travaux plus récents montrent qu'en ingérant de la litière, *L. terrestris* modifie la structure de la communauté fongique par rapport à celle de la litière ou du sol. Il favorise ainsi la colonisation de la litière par la microflore du sol mais il étend aussi le domaine d'action de la microflore de la litière au sol (Tiunov et Scheu, 2000a). Orazova *et al.* (2003) précisent que l'effet significatif à l'échelle du turricule (mm) n'est plus visible à celle de la litière (cm). Les auteurs soulignent ainsi l'importance de la notion d'échelle spatiale dans la compréhension des interactions entre micro-organismes et invertébrés.

L'échelle temporelle est également importante dans la compréhension de ces interactions. En effet, Tiunov et Scheu (2000b) montrent que si la biomasse microbienne est peu affectée par l'ingestion (*L. terrestris*), elle diminue durant les 5 premiers jours d'âge du turricule. D'autre part, la respiration qui dépassait de 30 à 120 % les valeurs attendues dans les turricules frais devient inférieure aux valeurs attendues après 10 jours d'incubation.

Tiwari *et al.* (1989) ont montré que les activités de l'uréase, de la déshydrogénase et de la phosphatase étaient plus intenses dans les turricules. De fortes proportions d'ammonium (action de l'uréase) ont été mesurées dans les turricules frais (Syers *et al.*, 1979). Les turricules frais constituent des microsites préférentiels de dénitrification (processus 5 fois plus important comparé au sol) (Elliott *et al.*, 1990). La variabilité de ces activités métaboliques microbiennes et enzymatiques jouent sur la biodisponibilité des nutriments dans l'espace (turricules vs sol non remanié) et dans le temps (turricules frais vs turricules âgés).

I.4 Cadre de l'étude et hypothèses de recherche

Ce travail de thèse a reçu le soutien du Conseil Régional de Bretagne par l'attribution d'une bourse doctorale régionale. Il s'est aussi inscrit dans le programme de recherche TRANZAT issu de l'appel d'offre « Devenir des Contaminants dans l'Environnement et Effets sur les Ecosystèmes » lancé par le **Programme Environnement Vie et Sociétés du CNRS, comité Ecosystèmes et Environnement**. Programme pluridisciplinaire associant sept laboratoires qui représentent quatre domaines disciplinaires : chimie, microbiologie, biogéochimie et écologie, TRANZAT aborde plusieurs aspects de la dynamique d'un herbicide contaminant dans un éco-complexe agrosystème / zone humide / cours d'eau. La molécule atrazine a servi de modèle à l'ensemble des recherches. Le questionnement majeur est de savoir dans quelle mesure et par quels mécanismes les organismes édaphiques régulent les dynamiques physiques et chimiques de l'atrazine. Les investigations ont été menées à trois échelles d'investigation : étude des interactions herbicide/argiles/bactéries à l'échelle moléculaire, étude du rôle d'organismes représentatifs du sol (plante crucifère sauvage, macrofaune lombricienne) et de leurs interactions avec les microorganismes à l'échelle du profil de sol et à celle des microsites de sol. De façon complémentaire, ce projet aborde aussi les effets de la circulation de ce contaminant dans le milieu naturel (risques *a posteriori*), d'une part sur les communautés algales et dulcicoles non cibles présentes en zone réceptrice aval et, d'autre part sur la dénitrification, processus –clef des zones humides en matière de régulation des pollutions par les nitrates (conséquences fonctionnelles).

Dans le cadre de ce projet et au regard des actions reconnues des lombriciens sur les propriétés des sols d'une part, et de leurs interactions avec les microorganismes du sol d'autre part, nous nous sommes attachés à caractériser et à quantifier leur rôle régulateur sur le devenir d'un herbicide modèle, la molécule atrazine. Il s'est agi plus particulièrement de tester deux hypothèses :

Hypothèse 1 : La macrofaune lombricienne contribue à la dégradation partielle ou totale de l'atrazine en stimulant l'activité de la microflore dégradante.

Il s'agira ici de savoir si les lombriciens, en tant qu'organismes structurants des sols, participent aux mécanismes microbiologiques qui favorisent l'atténuation naturelle des pollutions dans les sols. Autrement dit, les lombriciens sont-ils des acteurs et / ou régulateurs potentiels dans un processus de bioremédiation des sols ?

Hypothèse 2 : La macrofaune lombricienne favorise la liaison de l'atrazine avec les complexes argilo-humiques du sol, au sein de microsites conduisant ainsi à une rétention et une rémanence de l'herbicide.

Il s'agira ici de déterminer et de quantifier la distribution spatiale de l'atrazine et de ses métabolites en lien avec la présence de lombriciens, dans les biostructures lombriciennes (turricules, galeries) et le sol non remanié. Autrement dit, les lombriciens contribuent-ils à la séquestration et donc à l'augmentation du temps de résidence (rémanence) de l'atrazine dans le sol ?

L'approche méthodologique repose sur des expérimentations contrôlées et reproductibles à trois échelles de perception : à l'échelle du microsite et du microcosme lors d'expérimentations menées au laboratoire et à une échelle supérieure, en mésocosmes, lors d'expérimentations menées au terrain.

Dans un premier temps, les indicateurs biologiques, témoins du fonctionnement des sols au cours de nos expérimentations ont été contrôlés de manière à valider les résultats sur la dynamique de l'atrazine dans le sol. Puis la contribution de la macrofaune lombricienne à la dégradation partielle ou totale de l'atrazine par stimulation de l'activité de la microflore dégradante est étudiée par mesure des cinétiques de minéralisation de molécule marquée (^{14}C -atrazine). D'autre part des mesures de capacité potentielle de dégradation de l'atrazine par la microflore présente et par une bactérie dégradante inoculée (*Pseudomonas* sp. ADP) ont été comparées dans les biostructures et dans le sol non influencé par la macrofaune.

Enfin la redistribution et la circulation de l'atrazine ainsi que sa disponibilité (formation de résidus non-extractibles) dans le sol et dans les biostructures ont été quantifiés après différentes périodes d'incubation.

CHAPITRE II METHODOLOGIE, EXPERIMENTATION CONTROLEE ET CHANGEMENT D'ECHELLE

II.1 Introduction

Les objectifs de cette étude sont d'identifier les mécanismes fins par lesquels les lombriciens influencent la minéralisation, la distribution et la biodisponibilité de l'atrazine dans le sol. Les expérimentations ont été menées pour quantifier ces voies d'actions et en appréhender la portée à l'échelle du sol et de son fonctionnement. Notre démarche repose sur l'utilisation de microcosmes, de mésocosmes et de traceurs moléculaires.

Les études au terrain sur les lombriciens sont limitées. En effet de multiples variables sont non-contrôlables et susceptibles de créer des contraintes vis à vis des expérimentations : le nombre d'espèces, leur activité, l'âge des structures lombriciennes, les perturbations anthropiques. Toutes les espèces n'ont pas le même mode d'action dans les sols et sont ainsi à l'origine de structures hétérogènes en taille, en forme et en propriétés (Bouché, 1977). Pour identifier et quantifier l'influence des lombriciens sur le devenir de l'atrazine dans les sols et pour comparer les résultats, il apparaît nécessaire de contrôler les individus impliqués dans les expérimentations (espèce, biomasse, stade de développement).

L'usage de systèmes contrôlés et incubés au laboratoire permet de s'affranchir des variations des conditions biotiques et abiotiques du milieu naturel et de comparer les effets des lombriciens dans une même unité de temps et d'espace. Les lombriciens et l'atrazine constituent alors les seuls facteurs variants entre les systèmes. L'usage d'un sol homogénéisé permet de dater et compartimenter les structures mises en place par les lombriciens (biostructures) et ainsi de comparer ainsi leur influence respectives de manière répétitive. En limitant le nombre de variables agissant au sein des dispositifs expérimentaux, l'approche quantitative est ainsi ciblée sur l'action des individus et sur leurs interactions avec les micro-organismes.

Le microcosme est une enceinte dans laquelle sont introduits un nombre limités de compartiments issus du milieu naturel (sol, litière, vers...) et maintenu dans des conditions mésologiques contrôlées (Beyers, 1963). Les microcosmes présentent des inconvénients connus puisque ce sont des dispositifs de volume limité où le tassement du sol, l'absence de gradient thermique et hydrique et l'effet de bordure (volume de sol par rapport au volume de parois) interfèrent dans l'étude. Ainsi les résultats obtenus ne sont pas directement généralisables. Leur portée est limitée au fonctionnement du dispositif expérimental étudié mais ils ont pour intérêt majeur d'apporter des réponses sur les mécanismes mis en jeu dans le fonctionnement observé.

Nous nous sommes donc attachés à rapprocher les observations obtenues au laboratoire en microcosme avec celles obtenues au terrain, en mésocosmes, dans une tentative de validation des observations. A l'instar des microcosmes, les mésocosmes sont des enceintes plus grandes où l'échelle des compartiments introduits est supérieure (Volume de sol considéré, assemblage de populations et non d'individus), et qui sont placées au terrain et ainsi soumises aux conditions naturelles de température et de pluviométrie. Ces dispositifs physiquement limités permettent d'approcher davantage les conditions naturelles tout en conservant un contrôle sur les systèmes mis en place.

L'usage d'enceintes closes permet d'éviter à la fois la fuite des lombriciens comme celle de la molécule apportée. En effet l'analyse du devenir de l'atrazine dans le sol est ici approchée au moyen de molécule marquée au ^{14}C , et les microcosmes ou les mésocosmes présentent l'avantage de limiter les pertes vers l'extérieur et de quantifier son devenir de manière plus précise. Les molécules radiomarquées présentent également des contraintes d'utilisation et pour des raisons évidentes de contamination son utilisation *in situ* est impossible. L'usage de la radioactivité au cours de nos expérimentations est motivé par la traçabilité précise de la molécule apportée au sol, dans ses transferts entre les différents compartiments. La minéralisation de la molécule et sa distribution au sein des compartiments de sol sont ainsi quantifiables. De plus la quantification des résidus non extractibles d'une molécule organique est par définition impossible par extraction via des solvants ; elle est réalisée au final par la détection de la radioactivité restante après combustion du sol.

II.2 Les dispositifs expérimentaux

II.2.1 Les enceintes expérimentales

II.2.1.a Etude au laboratoire, en microcosme de sol

Le microcosme est une enceinte composée de deux cylindres de polychlorure de vinyl (PVC) superposés (figure II.1). L'enceinte est fermée hermétiquement par deux bouchons vissant aux deux extrémités. La partie supérieure constitue l'habitat des vers de terre. Elle comprend le piège à gaz carbonique et la colonne de terre d'un volume de $1,04 \text{ dm}^3$ (hauteur: 15 cm, diamètre intérieur: 9,4 cm). La partie inférieure, séparée de l'élément supérieur par une toile de nylon (vide de maille 0,5 mm), comporte un bécber pour la récupération des percolats.

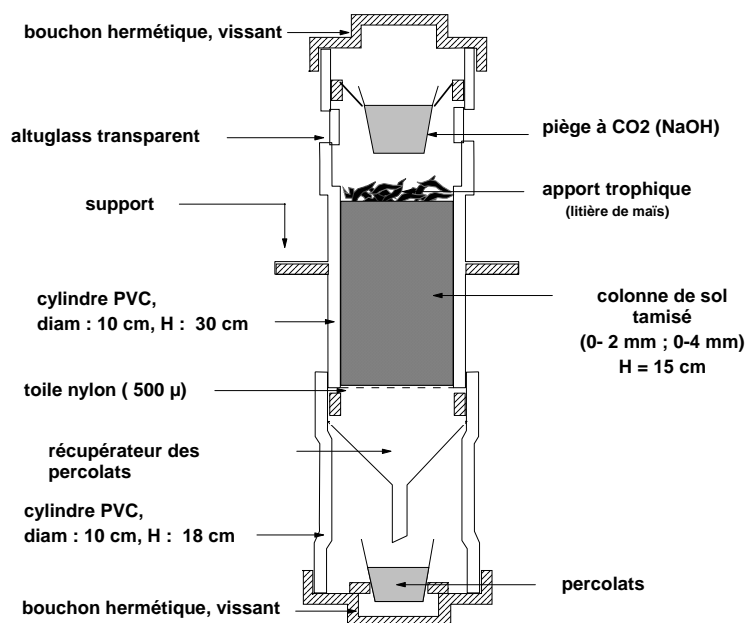


Figure II.1 : Schéma du dispositif expérimental ou microcosme (d'après Binet et Tréhen, 1992).

II.2.1.b Etude au terrain, en mésocosme

Un important travail de conception et de construction des mésocosmes a été réalisé au laboratoire par M. Lefeuvre. Le mésocosme est une enceinte en PVC (30 cm * 30 cm * 40 cm de hauteur ; volume de sol contenu : 36 dm^3), avec un fond concave et percé en son centre (figure II.2). En contrebas, un tuyau horizontal d'1 m de long permet l'évacuation des percolats à

l'extérieur du mésocosme. Les percolats sont collectés dans un flacon placé à l'extrémité du tuyau et protégé par un tube en PVC vertical (hauteur 80 cm ; diamètre : 20 cm).

A l'embouchure du tube évacuateur, une grille en inox (de maille de 0,5 cm) est placée, afin d'éviter la fuite des vers et son colmatage par le sol. A la base du mésocosme le lit de graviers constitue une épaisseur de 5 cm.

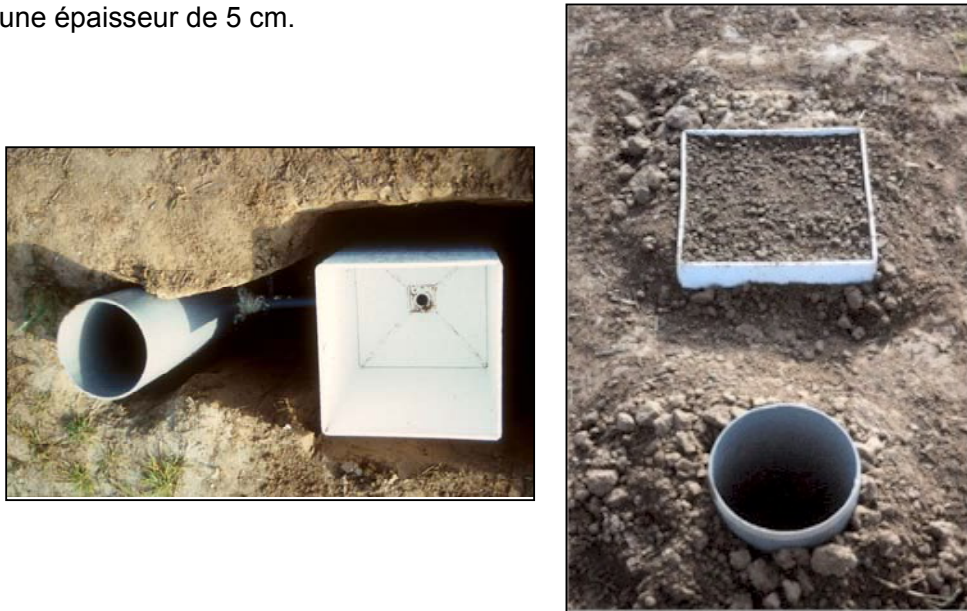


Figure II.2 : Photos du dispositif expérimental en cours d'installation et installé.

Un monolithe de sol de volume correspondant à celui du mésocosme vide a été excavé par couches successives. Chacune a été remplacée dans l'ordre respectif après avoir été émietée à la main, puis est recompressée à la main de manière à respecter la densité initiale ($1,40 \text{ g.cm}^{-3}$).

Afin d'éviter la fuite de vers, un couvercle non hermétique, constitué d'un cadre en bois sur lequel est fixée une toile de maille 0,5 mm, couvre le mésocosme.

II.2.2 La terre

La terre utilisée provient de l'horizon superficiel (0-30 cm) d'une parcelle cultivée en alternance maïs-féverole depuis au moins 1997 et située sur le domaine expérimental de l'INRA (35, Vezin-Le-Coquet). Il s'agit d'un sol limono-argileux (sables: 11%; limons: 74%; argile: 15%) à très faible teneur en matières organiques (1,81 %) et légèrement acide ($\text{pH} = 6,4$) (Gascuel-Odoux *et al.*, 1995).

Pour les expérimentations au laboratoire, en microcosmes, la terre récoltée est conditionnée (tableau II.1). Séchée à l'air libre pour la première expérimentation, nous avons par la suite utilisé directement du sol frais pour conserver l'activité microbienne initiale. D'autre part, la terre est tamisée à 2 mm dans la première expérience et à 4 mm dans les autres expérimentations au

laboratoire. La déstructuration trop poussée conduit à des problèmes d'engorgement et d'asphyxie du sol à la base.

Tableau II.1 : Conditionnement de la terre pour les expérimentations au laboratoire et au terrain

Expérimentation 1 : Minéralisation et distribution de l'atrazine	Expérimentation 2 : Minéralisation réelle et potentielle	Expérimentation 3 : Inoculation de bactérie dégradante	Expérimentation 4 au terrain
Sol séché (air libre) Tamisage : 0-2 mm	Sol frais Tamisage : 0-4 mm	Sol frais Tamisage : 0-4 mm	Sol frais Non tamisé mais émietté
Réhumecté à 20 % avant compactage 150 mL d'eau distillée en surface	humidité du sol 22,3% 25mL d'eau distillée	humidité du sol 21,6%	

Chaque microcosme reçoit 1520 g de sol en poids équivalent sec (105°C) répartis en 3 fractions compactées à la densité apparente *in situ* soit 1,46 g.cm⁻³. Dans l'Exp. 1 avec du sol séché, la terre est réhumidifiée à 20 % du poids sec, avant introduction et compactage (tableau II.1).

De même, en fonction du conditionnement de la terre, la colonne de sol est humidifiée par des apports d'eau distillée en surface (tableau II.1).

Au terrain, le sol est émietté à la main, débarrassé des cailloux, des végétaux et des vers puis remplacé au sein des mésocosmes par couches respectives *i. e.* 0-5 cm ; 5-10 cm ; 10-20 cm ; 20-30 cm ; 30-40 cm. Le sol est alors compacté à la main à l'aide d'un tasseur de manière à replacer la quantité de sol correspondant au bloc prélevé et à la contenance du mésocosme.

II.2.3 Les lombriciens.

Dans le cadre des expérimentations conduites au cours de cette thèse les vers introduits appartiennent à des catégories écologiques différentes et ont des modes d'action différents (Bouché, 1977). Les espèces introduites sont les deux espèces dominantes du peuplement de la parcelle agricole étudiée : l'espèce épi-anécique : *Lumbricus terrestris* (Linné, 1758) et l'espèce endogée : *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826). Les vers sont collectés, sur la même parcelle que la terre, par la méthode au formol (Bouché et Aliaga, 1986) puis rincés à l'eau plusieurs fois, et acclimatés pendant une semaine au minimum dans la terre utilisée pour l'expérience. Les lots de vers constitués, présentent des biomasses totales proches.

Au laboratoire, les vers introduits dans les microcosmes sont au nombre de trois, un individu juvénile *Lumbricus terrestris* et deux individus adultes: *Aporrectodea caliginosa* dont les caractéristiques de biomasses individuelles et totales sont reportées dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : biomasses individuelles et totales des lombriciens pour les trois expérimentations en microcosmes

Poids moyen (± erreur standard)	Expérimentation 1	Expérimentation 2	Expérimentation 3
<i>Lumbricus terrestris</i>	2,55 g (± 0,19)	2,54 g (± 0,10)	1,44 g (± 0,05)
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	0,54 g (± 0,02)	0,42 g (± 0,02)	0,38 g (± 0,01)
Biomasse totale par microcosme	3,63 g (min: 2,45g, max: 4,66g)	3,38 g (± 0,06)	2,20 g (± 0,04)

Pour les microcosmes avec vers, les lombriciens sont posés en surface. Les turricules émis consécutivement à la pénétration des vers dans le sol sont enlevés.

Au terrain, le nombre d'individus présent par m² sur la parcelle, est utilisé pour calculer le nombre de vers à introduire dans les mésocosmes : 275 individus.m², avec 69 % d'*Aporrectodea caliginosa* et 11 % de *Lumbricus terrestris* (Le Bayon, 1999). Dans les modalités avec vers, un premier apport de lombriciens est effectué au mois de février : 7 *Lumbricus terrestris* (14,62 g ±0,08 dont 2 adultes et 5 juvéniles) et 16 *Aporrectodea caliginosa* (5,48 g ±0,00 dont 10 adultes et 6 juvéniles), soit une biomasse totale de 20,9 g (±0,08). Pour pallier à d'éventuelles et probables mortalités et fuites d'individus, deux lots complémentaires ont été apportés (10 % de la biomasse initiale apportée). En avril 2 *L. t.* juvéniles (2,84 g ±0,11) et 3 *A. c.* (1,01 g ±0,02) sont ajoutés. En juin (81^e jour) 4 *L. t.* juvéniles (4,80 g ±0,02) sont ajoutés. La biomasse totale théoriquement introduite est de 28,74 g (±0,10) soit 22,25 g (±0,11) pour *Lumbricus terrestris* et 6,49 g (±0,02) pour *Aporrectodea caliginosa*. La biomasse totale introduite est intermédiaire (319 g.cm⁻²) aux données de biomasse obtenues au champ par Le Bayon (1999), soit 100 g.m⁻², et les biomasses utilisées en microcosmes pour les expérimentations au laboratoire (523 g.m⁻²). Les quantités de vers récupérées au terrain ne correspondent pas aux quantités introduites. D'une part, des mortalités ou des fuites possibles dans un premier temps, nous ont conduits à introduire de nouveau des individus *L. terrestris* et *A. caliginosa*. D'autre part, les volumes de sol manipulés augmentent la probabilité de ne pas retrouver tous les individus existants. Toutefois, les quantités récupérées correspondent, au maximum, aux quantités introduites lors du premier apport, ce qui indique que les biomasses lombriciennes introduites ne sont pas surestimées pour l'aire des mésocosmes. Ceci permet donc de valider les résultats acquis au terrain.

II.2.4 Inoculum de *Pseudomonas sp. ADP*

La souche bactérienne inoculée dans l'Exp. 2 est *Pseudomonas sp. ADP*, une souche bactérienne dégradant l'atrazine.

Pseudomonas sp. ADP était maintenue sur un milieu de culture solide avec atrazine. La culture est maintenue, à partir d'une unique colonie dans des flacons erlenmeyer de 50 mL contenant 10 mL de milieu de culture auquel de l'atrazine est ajoutée (30 mg.L^{-1} , de concentration finale). Pour leur croissance les cultures sont soumises à une agitation continue (28°C , 150 rpm). La pureté de la culture bactérienne est vérifiée par analyse de l'ADN ribosomal 16S (ADNr-16S) et des gènes *atz* par PCR. 1 mL de la culture mère est ensuite utilisé pour inoculer 400 mL de milieu TY placés dans des flacons erlenmeyer de 1 litre. La croissance des cultures est assurée par agitation continue pendant 15 H (28°C , 150 rpm). Les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min. Les boulettes bactériennes sont lavées deux fois avec un tampon minéral salé (K_2HPO_4 (1 g.L^{-1}), KH_2PO_4 (1 g.L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40 mg.L^{-1}), FeCl_3 (4 mg.L^{-1}) ; pH 6,6) et finalement remises en suspension dans 500 mL de milieu de culture sans atrazine.

Le sol est inoculé avec $4,4 \cdot 10^6$ cfu par gramme de sol (soit 30 mL d'inoculum de concentration $2,2 \text{ cfu } 10^8 \text{ mL}^{-1}$ par microcosme). Un volume équivalent de milieu de culture est appliqué sur les modalités sans bactérie. La colonne est ensuite reconstituée par compactage en trois fractions.

II.2.5 L'apport trophique.

L'apport trophique pour les vers est constitué de feuilles de maïs séchées et découpées en fragments de 1 cm environ. La litière est répartie de manière homogène sur la surface et de l'eau distillée est immédiatement apportée afin de la réhumidifier.

Au laboratoire, la litière est régulièrement apportée en surface de colonne. Le premier apport est réalisé 24^h après l'application d'atrazine. Les quantités de litière et d'eau apportées aux différentes dates sont répertoriées au sein du tableau II.3.

Tableau II.3 : Quantités (en poids sec, air) et dates des apports de litière et des apports d'eau distillée consécutifs au cours des incubations des microcosmes au laboratoire

	Expérimentation 1	Expérimentation 2	Expérimentation 3
Quantité de litière apportée	0,5 g aux jours 1, 11, 25, 40, 53 et 68.	0,25 g au jour 1 0,15 g aux jours 7, 15, 25, 35, 45 et 55.	Aucun apport de litière ni d'eau distillée durant les 9 jours d'incubation
Quantité totale	43 jours : 1,5 g 86 jours : 3 g	11j- :0,4 g ; 21j- :0,55 g ; 32j- :0,7 g ; 40j-:0,85 g ; 50j- :1 g ; 60j- :1,15 g.	Total : 0
Quantité d'eau distillée apportée	10 mL à chaque date	10 mL à chaque date	Total : 0

Pour l'Exp. 1, dans les microcosmes sans vers, afin de limiter la prolifération et le développement de champignons filamenteux sur la litière (Binet, 1993) et pour imiter le comportement fouisseur des vers, la litière est partiellement enfoncée dans les premiers centimètres du sol, environ 72^h après son apport. Ce moment correspond à un remaniement effectif de la litière par les vers, dans les microcosmes où ils sont présents.

Dans l'Exp. 2, dans les microcosmes sans vers, la litière est enfouie dans une « galerie » manuellement creusée afin de palier les effets secondaires provoqués par la technique précédemment utilisée, à savoir une litière partiellement enfoncée dans les premiers centimètres du sol. Cependant pour permettre la comparaison avec l'Exp. 1, l'enfouissement partiel sur toute la surface du sol est appliqué à une série de microcosmes ($A^+ V^{2-}$, une répétition par date, soit un total de six microcosmes) de manière à comparer avec les résultats précédents. Au cours de cette expérimentation, la litière est remaniée 96^h après son application pour les microcosmes des modalités sans vers, délai de remaniement effectif de la litière dans les modalités avec vers.

Au terrain seulement 1 et 0,5 g de litière respectivement pour les modalités avec et sans vers sont apportés à 88 jours, peu de temps après le dernier apport de lombriciens (81^e jour). La litière est réhumidifiée par apport de 300 ml d'eau.

II.2.6 Apport de l'herbicide.

La dose d'application choisie pour l'ensemble des expérimentations de notre étude, est celle conseillée pour les applications au champ à savoir 1 Kg de matière active / ha.

En microcosmes, au laboratoire, cette dose d'application correspond à 0,7 mg et 9 mg d'atrazine respectivement pour la surface correspondante des microcosmes et des mésocosmes. Pour identifier et quantifier les voies de transfert, une partie de l'atrazine appliquée est radioactive et

le reste est non marqué. L'atrazine est marquée au ^{14}C sur le noyau de la molécule. Les caractéristiques des sources utilisées sont répertoriées en fonction des expérimentations dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Caractéristiques des molécules d'atrazine ^{14}C et non marquées, utilisées au cours des expérimentations

	Expérimentations concernées	Exp. 1 en microcosmes	Exp. 2 en microcosmes Exp. 2 en microsites	Exp. 3 en microcosmes	Exp. 3 en microsites	Exp. 4 au terrain
Atrazine froide	Origine	Atrazine Pestanal, Riedel-de-Haën				
Atrazine ^{14}C	Origine	Sigma-Aldrich				
	Radioactivité spécifique (mCi.mmmole ⁻¹)	18,6	16,6	/	24,6	37,7
	Pureté	95 %	95 %		98%	95 %

Pour l'Exp. 2, une deuxième application d'atrazine est réalisée sur des microsites de sol isolés à partir des colonnes. Les quantités de solution apportées sont ajustées en fonction des quantités de sol et donc de leur humidité résiduelle (La liste des quantités de radioactivité apportée est présentée en annexe 1).

Dans l'Exp. 3, les microsites de sol incubés ont la même masse (0,5 g en équivalent sec), la quantité de radioactivité appliquée est donc identique pour tous (0,16 KBq par microsite).

Les pourcentages d'atrazine marquée, la solubilité utilisée pour la préparation des solutions et la quantité de radioactivité apportée par échantillon sont répertoriés dans le tableau II.5 en fonction des expérimentations.

Tableau II.5 : Caractéristiques des solutions d'atrazine appliquées sur les colonnes de sol au cours des trois expérimentations au laboratoire

Expérimentation	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 3	Exp. au terrain
		microcosmes	microsites	microcosmes	microsites	mésocosmes
% de ^{14}C -atrazine	54,2 %	19,4 %	2,4%	0 %	0,43 %	8,6 %
Solubilité choisie	33 mg.L ⁻¹	31 mg.L ⁻¹	20,5 mg.L ⁻¹	28 mg.L ⁻¹	30 mg.L ⁻¹	27 mg.L ⁻¹
Radioactivité totale	965,5 KBq.	340,6 KBq	≈ 8,7 KBq	/	0,16 KBq	4207 KBq
Radioactivité.g ⁻¹ sol	635 Bq	224 Bq	872 Bq	/	320 Bq	84 Bq

En microcosmes, la solution d'atrazine est répartie à la pipette sur la surface des colonnes après que les lombriciens se soient introduits dans le sol. Un volume d'eau distillée équivalent a été apporté sur les microcosmes ne recevant pas d'atrazine (tableau II.6).

Tableau II.6 : Volume de l'apport d'eau distillée et d'atrazine et délai séparant l'introduction des vers et l'application d'atrazine.

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Volume apporté avec l'atrazine	23,10 mL	23 mL	25 mL	333 mL
Délai entre l'apport de vers et l'application d'atrazine	48 H	96 H	24 H	- 92 jours vers avant atrazine

II.2.7 Incubation et maintenance des dispositifs

Les microcosmes sont incubés à 12°C (température moyenne du printemps et de l'automne en régions tempérées) avec une photopériode 12 : 12 pendant des temps d'incubation différents en fonction des expérimentations et notées dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Temps d'incubation des microcosmes au cours des trois expérimentations au laboratoire et temps d'expérimentation au terrain.

Exp. 1	Exp. 2	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 3	Exp. 4
microcosmes	microcosmes	microsites	microcosmes	microsites	mésocosmes
43 et 86 jours	11, 21, 32, 40, 50 et 62 jours	26-29 jours	9 jours	28 jours	174 jours

Durant l'Exp. 1, des apports réguliers d'eau distillée sont effectués: 10 mL d'eau juste après l'ajout de litière pour la réhumecter (sauf au premier apport), puis 15 mL, 6 jours plus tard, soit un total de 25 mL en 2 semaines. Pour les six dernières semaines (et donc pour la moitié des microcosmes), seuls 10mL sont apportés tous les 15 jours. Ainsi, les quantités totales d'eau apportées sur 43 et 86 jours sont respectivement de 50 et 80mL.

Pour l'expérimentation 2, 10 mL d'eau distillée sont apportés consécutivement à l'apport de litière, ainsi les quantités totales apportées pour les six durées d'incubation sont respectivement de 20, 30, 40, 50, 60 et 70 mL.

Les mésocosmes sont installés au terrain et de ce fait soumis aux conditions de pluviométrie et de température naturelles.

L'introduction de vers en février est précédée d'un apport d'eau distillée (1,5 L) de manière à faciliter leur insertion.

L'atrazine est appliquée le 04 mai, compte tenu des fortes précipitations avant cette date.

II.3 Les expérimentations et leurs modalités

II.3.1 Expérimentation 1, au laboratoire en microcosmes :

minéralisation, distribution et biodisponibilité de l'atrazine

Dans un premier temps, nous avons testé séparément et conjointement le rôle des vers sur la minéralisation de l'atrazine et sur la distribution de l'atrazine d'une part et l'effet de l'atrazine sur l'activité minéralisatrice du carbone d'autre part. Les traitements appliqués aux microcosmes ont été avec ou sans vers et avec ou sans atrazine (tableau II.8).

Tableau II.8: Modalités expérimentales de l'Exp. 1.

	Sans Vers	Avec Vers
Sans Atrazine	A ⁻ V ⁻ (n = 6) témoin	A ⁻ V ⁺ (n = 6)
Avec Atrazine	A ⁺ V ⁻ (n = 6)	A ⁺ V ⁺ (n = 6)

La minéralisation du carbone du sol (voir § II.4.2), la minéralisation de l'atrazine (voir § II.4.2) et la percolation de radioactivité (voir § II.4.3) sont suivies. Chacune des quatre modalités comprend six répétitions dont la moitié est déstructurée après 43 jours d'incubation et l'autre moitié après 86 jours d'incubation. Des microsites de sol sont alors prélevés et analysés pour déterminer la distribution de la radioactivité en tenant compte de sa biodisponibilité grâce à l'extraction différentielle des résidus de l'atrazine à partir du sol (voir § II.4.3).

II.3.2 Expérimentation 2, au laboratoire : minéralisation potentielle de l'atrazine à l'échelle des microsites de sol

De manière à expliciter les différences de minéralisation de l'atrazine entre les microcosmes avec vers et ceux sans vers, une étude expérimentale a été établie pour rechercher quels microsites de sol sont en cause. La première partie de l'expérimentation est effectuée en microcosmes. Les traitements appliqués sont : avec atrazine et avec ou sans vers (tableau II.9).

Tableau II.9 : Modalités expérimentales de l'Exp. 2.

	Avec Vers	Sans Vers Litière enfouie dans une fausse galerie	Sans Vers 2 Litière enfouie sur la surface
Avec Atrazine	A ⁺ V ⁺ (n = 3 * 6)	A ⁺ V ⁻ (n = 3 * 6)	A ⁺ V ²⁻ (n = 1 * 6)

La minéralisation du carbone total (voir § II.4.3) et de l'atrazine (voir § II.4.3) sont suivies en microcosmes. Une série de microcosmes est déstructurée à chacune des six dates choisies 11 jours, 21 jours, 32 jours, 40 jours, 50 jours et 62 jours : trois répétitions des modalités A⁺ V⁺ et A⁺ V⁻ et une colonne pour la modalité A⁺ V²⁻. Des microsites de sol de taille approximativement identique sont alors prélevés et incubés (à 20°C, à l'obscurité) en bocaux (75 cL) (voir § II.) après une deuxième application d'atrazine-¹⁴C. Cette deuxième application d'atrazine constitue une stimulation des microorganismes et en particulier des microorganismes dégradant l'atrazine. Les résultats obtenus correspondent donc à la minéralisation potentielle de l'atrazine. La minéralisation du carbone total (voir § II.4.3) et de l'atrazine (voir § II.4.3) sont alors suivies en continu au sein de ces microsites de sol pendant environ 26-29 jours.

La modalité « Sans vers 2 » correspond à la modalité témoin de l'Exp. 1 et a été mise en place pour établir une correspondance des résultats de minéralisation du carbone total et de l'atrazine entre les deux types d'enfouissement de litière (sur la surface Exp. 1 et dans une fausse galerie Exp. 2) pour imiter le comportement du ver au sein de la modalité témoin.

II.3.3 Expérimentation 3, au laboratoire : minéralisation de l'atrazine, interactions lombriciens-microorganismes à l'échelle des microsites

De manière à expliciter les différences de minéralisation de l'atrazine entre les microcosmes avec vers et ceux sans vers, une étude expérimentale a été établie pour rechercher quelle est l'influence des interactions entre lombriciens et microorganismes dans les microsites de sol remaniés ou non par les vers.

La première partie de l'expérimentation est effectuée en microcosmes. Les traitements appliqués sont : avec ou sans vers, avec ou sans atrazine, avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (tableau II.10). Chacune des huit modalités comprend trois répétitions.

Tableau II.10 : Modalités expérimentales de l'Exp. 3.

	Avec Vers		Sans Vers	
Sol	SV	(n = 3)	S	(n = 3)
Sol + Atrazine	SAV	(n = 3)	SA	(n = 3)
Sol + <i>Pseudomonas</i>	SPV	(n = 3)	SP	(n = 3)
Sol + <i>Pseudomonas</i> + Atrazine	SPAV	(n = 3)	SPA	(n = 3)

Au terme des neuf jours d'incubation les microcosmes sont déstructurés et des microsites de sol sont échantillonnés.

A partir de ces échantillons de sol, les acides nucléiques sont extraits (voir § II.4.4). Un rendement d'extraction et le ratio ADN / ARN qui exprime l'activité globale dans les microsites sont calculés (voir § II.4.4.b). L'ADN extrait est analysé : la diversité des communautés bactériennes et fongiques au sein des microsites de sol est caractérisée par RISA (voir § II.4.4.b). D'autre part des gènes codant pour des enzymes responsables des premières étapes de la dégradation accélérée de l'atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP (gènes *AtzA*, *B* et *C*) sont quantifiés par PCR en temps réel (voir § II.4.4.b).

La capacité dégradante de microsites de sol de l'ensemble des modalités a été déterminée. Des microsites de sol échantillonnés à partir des microcosmes incubés et précédemment décrits sont aliquotés. Ces microsites sont incubés à 20°C, à l'obscurité après une seconde application d'atrazine marquée au ¹⁴C sur le noyau. La minéralisation de l'atrazine est quantifiée sur 28 jours (voir § II.4.2).

II.3.4 Expérimentation 4, au terrain au laboratoire : minéralisation, distribution et biodisponibilité de l'atrazine

Afin de tester les premiers résultats obtenus au laboratoire en conditions contrôlées et pour étudier le rôle des vers sur la minéralisation, la distribution et la biodisponibilité de l'atrazine dans le sol de façon plus réaliste, l'expérimentation 4 a été mise en place au terrain et dans des dispositifs de taille supérieure, les mésocosmes. Les traitements appliqués sont : avec atrazine et avec ou sans vers, avec six répétitions par modalité (tableau II.11).

Tableau II.11 : Modalités expérimentales de l'Exp. 4.

	Sans Vers	Avec Vers
Avec Atrazine	A ⁺ V ⁺ (n = 6)	A ⁺ V ⁻ (n = 6)

De l'atrazine marquée au ¹⁴C sur le noyau est apportée en surface du sol des mésocosmes et l'activité minéralisatrice du carbone du sol (voir § II.4.2), la minéralisation de l'atrazine (voir § II.4.2), comme la lixiviation de l'herbicide (voir § II.4.3) sont suivies durant 174 jours (de mai à octobre). Au terme de cette période, les mésocosmes sont déstructurés et des microsites de sol sont échantillonnés pour déterminer la distribution de la radioactivité en tenant compte de sa biodisponibilité grâce à l'extraction différentielle des résidus de l'atrazine à partir du sol (voir § II.4.3). Les métabolites de dégradation de l'atrazine sont déterminées dans certains échantillons lixiviés et microsites de sol (voir § II.4.3b).

II.3.5 Microsites de sol représentatifs

II.3.5.a Description

A la déstructuration des microcosmes et des mésocosmes, des microsites de sol sont isolés pour analyse ou pour incubation. **Le sol non remanié par les vers** est prélevé à différentes hauteurs pour l'ensemble des modalités avec et sans vers. Les différentes profondeurs auxquelles sont prélevés les microsites de sol non remanié en présence et en absence de vers sont répertoriées au sein du tableau II.12 en fonction des expérimentations. 100 g d'aliquote sont collectés à chaque expérimentation, au moins à 2 cm de toute trace d'activité lombricienne.

Tableau II.12 – Prélèvements des microsites de sol non remanié

Expérimentations	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. au terrain
Sol non remanié en présence et en absence de vers	0-5 cm	0-2 cm	2-5 cm	0-5 cm
		2-5 cm		
	5-10 cm	5-10 cm		5-10 cm
	10-15 cm	10-15 cm		10-20 cm
				20-30 cm
				30-40 cm
Parois de galeries	Toutes les profondeurs mélangées			Par niveau de sol non remanié
Turricules	Tous les 15 jours	Au moment de la déstructuration		
Déjections	Par niveau de sol non remanié			
Endentères	oui	non	oui	non

Pour les dispositifs contenant des vers, des compartiments supplémentaires sont définis. Ils correspondent à des éléments de la drilosphère. Les caractéristiques de prélèvements de ces microsites de sol aux vers sont répertoriées au sein du tableau II.12. On distingue :

Les **parois de galeries** : les deux premiers millimètres des parois des galeries sont prélevés. En microcosmes, l'ensemble des parois de galeries est regroupé en un seul échantillon. En mésocosmes, les parois de galeries sont séparées par niveaux correspondant aux niveaux de sol non remanié (tableau II.12).

Les **déjections** : ce sont les déjections des lombriciens déposées au sein des galeries. Elles sont collectées au terrain par niveau de sol non remanié (cf tableau II.12) des niveaux de sol non remanié).

Les **turricules** : ce sont les déjections des lombriciens en surface. Pour l'Exp. 1, il sont prélevés tous les 8 jours et regroupés par lots d'une quinzaine de jours. Les turricules ont alors des âges maxima de 14, 28, 42, 56, 70 et 86 jours. Pour les autres expérimentations en colonnes ou en mésocosmes, ils sont récoltés au moment de la déstructuration des systèmes.

Les **endentères** : ce sont les contenus du tube digestif des lombriciens obtenus au moment de la déstructuration des dispositifs. Après isolement des individus sur papier filtre humidifié, en boîte de pétri pendant 24^h, les lombriciens excrètent le contenu de leur tube digestif.

Pour l'Exp. 2 en microcosmes où la capacité du sol à dégrader l'atrazine est analysée en fonction des microsites de sol liés à l'action des vers ou non, les microsites de sol sont incubés pour effectuer leur suivi. L'annotation des microsites en fonction de leur profondeur d'origine est répertoriée au sein du tableau II.13 avec S et V pour les microsites isolés respectivement à partir des colonnes sans et avec vers.

Tableau II.13 : Annotations des microsites de sol isolés de l'expérimentation 2 sur la minéralisation potentielle de l'atrazine au sein de microsites de sol liés au vers ou non.

	Microsites	Avec Vers	Sans Vers Litière enfouie dans une fausse galerie	Sans Vers2 Litière enfouie sur toute la surface
Sol non remanié par les vers	0-2 cm	V.2	S.2	S2.2
	2-5 cm	V.5	S.5	S2.5
	5-10 cm	V.10	S.10	S2.10
	10-15 cm	V.15	S.15	S2.15
Sol remanié par les vers	Turricules	V.T		
	Galeries	V.G		

Pour l'Exp. 3, les annotations sont, pour le sol environnant des microcosmes sans vers : **S-Se** ; pour le sol non remanié des microcosmes avec vers : **Sv-Se** ; pour le sol des turricules **Sv-Tu** ; pour le sol des parois de galeries **Sv-Ga** et le sol endentères **Sv-En**.

II.3.5.b Incubation

Après déstructuration des microcosmes et des mésocosmes, des microsites de sol sont échantillonnés et préparés pour être incubés.

Au cours de l'Exp. 2, 100 g ou le maximum de sol disponible sont collectés par microsite étudié et environ 10 g sont placés au sein de coupelles aluminium elles-mêmes placées au fond des bocaux en verre de 75cL. L'humidité des échantillons est calculée et le jour suivant la déstructuration, de l'eau distillée est apportée pour réhumidifier les échantillons et un volume de solution d'atrazine est appliqué sur les microsites en fonction de la quantité de sol. Les bocaux sont ensuite maintenus fermés pour le suivi de la minéralisation du carbone totale et de l'atrazine et incubés à 20°C, à l'obscurité pendant 26-29 jours. Le piège à soude est constitué d'un béccher placé en suspension au dessus du sol et accroché à l'ouverture du bocal.

Au cours de l'Exp. 3, 100 g ou le maximum de sol disponible sont collectés par microsite étudié. Des aliquotes de 0,5 g de sol de chaque microsite (en équivalent sec) sont placés dans les puits de plaques de micro-titration (24 puits). Un apport d'eau distillée est réalisée juste avant l'application de solution d'atrazine ¹⁴C, de manière à ce que l'humidité finale soit de 21 %. Les plaques sont recouvertes de papier Whatman constituant le piège pour le suivi de la minéralisation de l'atrazine et qui maintenu par une plaque en inox. L'ensemble est incubé à 20°C, à l'obscurité pendant 28 jours.

II.4 Analyses et dosages

II.4.1 Suivi biologique des vers.

Il s'agit d'évaluer la qualité des conditions d'incubation. Trois paramètres sont mesurés :
 les gains ou pertes de masse des vers en fin d'incubation,
 la consommation de litière
 la présence de cocons et de juvéniles au moment de la déstructuration des dispositifs.

II.4.2 Minéralisation du carbone total et de l'atrazine en particulier.

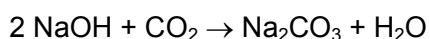
II.4.2.a Suivi de l'activité respiratoire par titrimétrie

La dynamique de la minéralisation du carbone sous forme de CO₂ est réalisée grâce à des pièges à soude dont les caractéristiques et les durées et fréquences de piégeages en fonction des expérimentations concernées sont répertoriées dans le tableau II.14.

Tableau II.14 : Caractéristiques des analyses du carbone total expiré

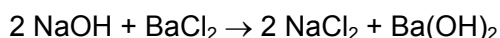
Suivi des	Exp. 1 au laboratoire microcosmes	Exp. 2 au laboratoire microcosmes	Exp. 2 au laboratoire microsites	Exp. 4 au terrain mésocosmes
NaOH :	0,5 N	0,5 N	0,5 N	0,5 N
Quantité	30 mL	30 mL	10 mL	60 mL
Durée de piégeage	24 ^h	24 ^h	48, 72 puis 96 ^h	24 ^h
Fréquence de piégeage	48 ^h	48 ^h	Continu	2 fois / semaine 1 fois / semaine
Durée du suivi	43 et 86 jours	11, 21, 32, 40, 50 et 60 jours	26-29 jours	174 jours

Le CO₂ est piégé par la soude selon le principe :

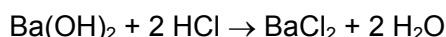


soit 40mg de NaOH mobilisé par 22 mg de CO₂ produit.

Une aliquote du piège (10 mL) diluée avec 10 mL d'eau distillée (20 mL à 0,25 N) est titrée avec de l'acide chlorhydrique (0,25N) selon les équations :



(le chlorure de Baryum empêche la fixation de CO_2)



La quantité de CO_2 respirée est mesurée par différence avec un blanc selon l'équation :

$$\text{QC}\text{CO}_2 = (\text{Vblanc} - \text{Vtest})\text{HCl} * 0,25 * 36,5 * 22/40$$

L'expression en mg de carbone est :

$$\text{QC-CO}_2 = \text{QC}\text{CO}_2 * 12/44 * (\text{Q NaOH du piège en fonction de Q NaOH dosée})$$

II.4.2.b Suivi de la minéralisation de l'atrazine par dosage de la radioactivité

Le suivi de la minéralisation de l'atrazine au cours de nos expérimentations est fondé sur le dosage de radioactivité émise sous forme de CO_2 . En effet, l'atrazine appliquée est marquée au ^{14}C sur les carbones du noyau de la molécule. Ainsi sa dégradation totale émet du CO_2 marqué, noté $^{14}\text{C-CO}_2$, quantifié ici par deux méthodes.

Au cours des expérimentations en microcosmes (Exp. 1, Exp. 2), en mésocosmes (Exp. 4) et au sein des microsites incubés lors de l'Exp. 2, la capacité du sol incubé dans les dispositifs à dégrader l'atrazine est dosée par l'intermédiaire du ^{14}C carbone retrouvé sous forme de CO_2 au sein des pièges à CO_2 (NaOH). Il est détecté à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Helwett-Packard). Avant l'ajout de BaCl_2 pour le dosage du CO_2 , 1 mL de soude à 0,5 N est pipeté puis ajouté à 5 mL de liquide scintillant (Hionic-Fluor, Packard dans Exp 1 ou Ultimagold, Packard dans les autres) dans une fiole de comptage, qui est ensuite stockée à 4°C avant comptage.

La quantité de radioactivité contenue dans la fiole mesurée par comptage en dpm, (1 mL échantillon / 5 mL LS : Hionic-Fluor, Packard ou Ultimagold, Packard ; Comptage : 2*5min) est ramenée au volume du piège pour avoir la quantité totale respirée et exprimée en Becquerel :

$$\text{Q}^{14}\text{C-CO}_2 \text{ (en Bq)} = (\text{Dpm} - \text{Dpm Blanc}) * (\text{V NaOH du piège}) / 60$$

$$1 \text{ Becquerel} = 1 \text{ dps} = 60 \text{ dpm}$$

$$1 \mu\text{Ci} = 3,7. 10^4 \text{ dps}$$

Au cours de l'Exp. 3 avec inoculation d'une bactérie dégradant l'atrazine, la capacité des micro-organismes indigènes du sol et de la communauté bactérienne inoculée (*Pseudomonas* sp. ADP) à dégrader l'atrazine sont suivies au niveau de microsites de sol par radiorespirométrie sur des dispositifs miniaturisés. Les échantillons de sol traités à l'atrazine marquée au ^{14}C sont incubés dans des plaques de 24 micro-puits et recouverts avec un papier Whatman trempé avec

une solution de barium hydroxide (BaOH) (Soulas 1993). Le ^{14}C -CO₂ provenant de la minéralisation de l'atrazine est précipité sur la papier Whatman et après 2H de séchage à 80°C, les membranes sont scannées à l'aide d'un phosphore imager (Storm®, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA). Les données obtenues sont analysées avec le programme ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA).

Les cinétiques de dégradation de l'atrazine ont été modélisées en utilisant le model de croissance Gompertz modifié [$y = ae^{-e^{-k(t-t_i)}} + ct$] avec SigmaPlot® 4.0. Quatre paramètres ont été déterminés : **a**, le plateau ou pourcentage maximum de minéralisation, **t_i**, l'abscisse du point d'inflexion, **k** la constante du taux de minéralisation et **c**, le taux de renouvellement de ^{14}C et de minéralisation co-métabolique. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

II.4.3 Distribution, disponibilité et mobilité de l'atrazine

Dans l'Exp. 1, les percolats sont récoltés toutes les deux semaines. Dans l'Exp. 4, au terrain, les percolats sont quant à eux vérifiés après chaque événement pluvieux et collectés. Leur volume est mesuré et la radioactivité présente est détectée par comptage à scintillation liquide après filtration ou non ; les caractéristiques des quantifications de la radioactivité sont répertoriées dans le tableau II.15.

Tableau II.15 – Caractéristiques des comptages de radioactivité dans les eaux percolées

	Expérimentation 1	Expérimentation au terrain
Filtration	/	0,45µm (GFC Whatman, µfibre de verre)
Composition	1 mL échantillon / 5 mL LS	1 mL échantillon / 4 mL LS
Répétition	/	3 reps
Liquide Scintillant	Hionic-Fluor, Packard	Ultimagold, Packard
Durée du Comptage	2 * 5 min	1 * 10 min
Compteur	Helwett-Packard	Tricarb 2100TR-Packard

La quantité de radioactivité est calculée en fonction du volume du percolat mesuré :

$$Q^{14}\text{C} \text{ (en Bq)} = (\text{Dpm} - \text{Dpm percolat témoin}) * V \text{ du percolat} / 60$$

Pour l'expérimentation 1 en microcosmes, en fin d'incubation, les vers et les cocons trouvés sont rincés et l'eau de rinçage est contrôlée au compteur à scintillation liquide dpm (1 mL échantillon / 5 mL LS : Hionic-Fluor, Packard ; Comptage: 2*5min). La quantité de radioactivité est calculée en fonction du volume du liquide de rinçage :

$$Q^{14}\text{C-CO}_2 \text{ (en Bq)} = (\text{Dpm} - \text{Dpm eau témoin}) * V \text{ liquide de rinçage} / 60$$

II.4.3.a Extraction des résidus d'atrazine ¹⁴C et quantification des résidus non extracibles à partir du sol.

Plusieurs compartiments de sol ont été définis pour l'extraction de l'atrazine et ses résidus et les prélèvements sont conditionnés pour l'extraction différentielle de l'atrazine et de ses métabolites. L'extraction différentielle est une extraction à l'aide de solvants à pouvoir d'extraction croissant, ici un solvant aqueux et un solvant au méthanol suivi d'une combustion du sol pour obtenir les métabolites non extractibles. Deux méthodes présentant quelques différences ont été appliquées pour les extractions différentielles entre les données obtenues à partir des microcosmes (Exp. 1) et des mésocosmes (Exp. 4, au terrain).

✓ Méthode d'analyse dans Exp. 1

Les analyses ont été réalisées en collaboration avec le CPB-CNRS de Nancy et la méthodologie alors utilisée a consisté en une extraction de la radioactivité répétée jusqu'à épuisement pour chaque solvant (aqueux et méthanolique).

Les échantillons sont séchés (60°C), broyés et homogénéisés. Des aliquotes de 3 à 5 g pour les turricules et les galeries (suivant les quantités disponibles) et 10g pour le sol environnant sont utilisées pour les extractions.

Extraction à l'eau et quantification des résidus : les échantillons de sol (3 et 5 g ou 10g) sont agités avec de l'eau distillée (30 mL ou 100 mL) pendant 1 heure, puis centrifugés 20 min à 20000 tours/min ou 11000 t/min. Le surnageant est récupéré et 1 mL est prélevé pour comptage de la radioactivité (1 mL échantillon / 5 mL LS : Ultimagold ; Comptage : 1*5 min, compteur à scintillation Packard Tri-Carb modèle 4430). Les extractions sont répétées jusqu'à épuisement de la radioactivité dans le surnageant.

Extraction au méthanol et quantification des résidus : le même protocole est utilisé mais le solvant est un mélange méthanol / eau (50 : 50). Après épuisement de la radioactivité dans l'extrait méthanol / eau, on effectue un rinçage du culot à l'eau distillée en procédant de la même manière que pour l'extraction à l'eau. L'eau de rinçage est ajoutée au volume d'extraction méthanol / eau.

Le total des extraits (eau ou méthanol / eau) pour chacun des échantillons est homogénéisé, le volume total est mesuré et 10 mL sont prélevés. Les 10 mL sont filtrés et 1 mL est prélevé pour comptage de la radioactivité (1 mL échantillon / 10 mL LS : Ultimagold ; Comptage : 3*10 min).

$Q^{14}C$ (en Bq / g de sol) = (dpm – dpm Blanc) * V total / Quantité de sol utilisé pour l'extraction / 60.

Quantification des résidus non extractibles : après extraction, les culots rincés sont séchés à 40°C, puis broyés au broyeur à bille. Pour doser la radioactivité résiduelle, on effectue la combustion de quelques mg d'échantillons avec un analyseur C H N (Carlo Erba type NA 1500). Le ¹⁴CO₂ issu de la combustion est piégé dans 10 mL de soude sur lesquels 1 mL servent au

comptage (1 mL échantillon / 10 mL LS : Ultimagold ; Comptage : 3*10 min). Un rendement de combustion et de comptage est déterminé par combustion d'étalon de glucose de radioactivité connue.

$Q^{14}C$ (en Bq / g de sol) = (cpm – cpm Blanc) * Rendement / Quantité de sol utilisé pour la combustion / 60.

✓ Méthode d'analyse dans Exp. 4

Les analyses ont été réalisées en collaboration avec l'INRA-Grignon et la méthodologie utilisée a consisté en une extraction aqueuse et deux extractions méthanoliques. Les extractions ne se font pas jusqu'à épuisement de la radioactivité qui peut déplacer l'équilibre dans les solutions d'extractions. Les échantillons de sol de turricules, de galeries et de déjections sont séchés à l'air libre, afin de ne pas perdre de matériel pour le calcul des humidités. Des aliquotes de 2, 5 ou 10 g équivalent sec sont pesés suivant les quantités disponibles.

Extraction à l'eau et quantification des résidus : les échantillons de sol (2, 5 ou 10 g) sont agités avec une solution de $CaCl_2$ (0,01 M) (le Ca^{2+} favorise la floculation des argiles et la séparation solide-liquide après centrifugation), avec le rapport sol / solvant (1 / 1) pendant 18 heures, puis centrifugés 15 min à 4900 tours/min à 20°C (échantillons de 10 g) et 15 min à 4900 tours/min à 20°C (échantillons de 2 et 5 g). La quantité de radioactivité du surnageant est quantifiée par comptage à scintillation liquide à l'aide d'un Tricarb 2100TR (Packard) (2 répétitions * 0,5 mL échantillon / 4 mL LS : Ultimagold ; Comptage : 2*10 min).

Extraction au méthanol et quantification des résidus : à la suite de l'extraction à l'eau, les échantillons de sol (2, 5 ou 10 g) sont agités avec du méthanol, avec le rapport sol / solvant (1 / 2). Trois extractions successives sont réalisées au méthanol, deux où l'agitation dure 18 H et la dernière qui dure 4 H. Après agitation les échantillons sont centrifugés 15 min à 4900 tours/min à 20°C et la radioactivité au sein des surnageants est quantifiée au moyen d'un compteur Tricarb 2100TR (Packard) ; (2 répétitions * 0,5 mL échantillon / 4 mL LS : Ultimagold ; Comptage : 2*10 min).

La quantité de radioactivité présente dans les surnageants est ensuite calculée

$Q^{14}C$ (en Bq / g de sol) = (dpm – dpm Blanc) * V total / Quantité de sol utilisé pour l'extraction / 60.

Quantification des résidus non extractibles : après extraction, les culots sont séchés sous hotte et broyés. Pour doser la radioactivité résiduelle, on effectue la combustion d'environ 200 mg d'échantillons avec un Oxidizer (Packard, Modèle 307). Le $^{14}CO_2$ issu de la combustion est piégé dans une colonne contenant un absorbant chimique du CO_2 : le carbosorb (Packard) qui est ensuite expulsé de la colonne à l'aide d'un liquide scintillant le permafluor (Packard). Le mélange ainsi formé est collecté directement dans un flacon à scintillation (10 mL) et prêt à compter en scintillation liquide (3 répétitions / mélange carbosorb / permafluor ; Comptage : 1*10 min).

Un rendement de combustion et de comptage est déterminé par combustion d'une solution étalon d'atrazine de radioactivité connue.

$Q^{14}C$ (en Bq / g de sol) = (cpm – cpm Blanc) * Rendement / Quantité de sol utilisé pour la combustion / 60.

✓ Rectificatif apporté aux données pour une comparaison entre les 2 méthodes

En ce qui concerne la différence entre les deux méthodes d'extractions différentielle des résidus de l'atrazine au sein du sol, la différence est surtout importante pour l'extraction à l'eau des résidus potentiellement disponibles. En effet des extractions répétées avec renouvellement du solvant et jusqu'à épuisement de la radioactivité finissent par déplacer l'équilibre du mélange et des quantités supérieures sont susceptibles d'être extraites avec le solvant aqueux. Ainsi pour établir une correspondance entre les deux méthodes d'analyse, un rectificatif est effectué entre les résidus extractibles à l'eau et extractibles au méthanol, pour l'Exp. 1. Pour l'Exp. 1, seule la première extraction aqueuse est prise en compte. La radioactivité extraite lors des extractions suivantes à l'eau est ajoutée à celle obtenue lors des extractions méthanoliques.

II.4.3.b Identification des métabolites de l'atrazine présents aux sein des échantillons

A partir de données collectées au terrain, les métabolites de l'atrazine sont recherchés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Les échantillons concernés sont issus de l'Exp. 4 : d'une part, quelques percolats principalement sur les premières dates de récolte et d'autre part, des extraits méthanoliques de l'extraction différentielle de la radioactivité du sol ont pu être analysés. En effet, seuls les échantillons de sol des premiers centimètres collectés dans les mésocosmes, ont révélé une radioactivité suffisante pour être détectés en HPLC.

Les volumes aqueux récoltés après lixiviation au travers des mésocosmes sont filtrés à 0,45 µm (GFC Whatman, µfibre de verre) puis concentrés sur colonne (Env+ 200 mg, Isolute™ SPE columns) à l'aide d'une pompe à vide. Avant le passage des échantillons les colonnes de concentration sont conditionnées par passage de 5*2 mL de méthanol suivi de 5*2 mL d'eau distillée. Puis les échantillons sont percolés lentement au travers des colonnes. Les colonnes sont ensuite lavées (2*2 ml d'eau distillée) et séchées à vide pendant 15 min au moins. Les échantillons sont décrochés de la colonne et récupérés par passage de 3*3mL de méthanol au travers des colonnes. L'échantillon aqueux concentré une première fois dans le méthanol est de nouveau concentré par évaporation à 39°C sous vide à l'aide d'évaporateurs rotatifs (Büchi RE 111) puis repris dans le méthanol.

Les volumes de méthanol des extractions à partir des échantillons de sol sont rassemblés en un seul échantillon et concentrés par évaporation à 39°C sous vide à l'aide d'évaporateurs rotatifs (Büchi RE 111) puis repris dans le méthanol.

Avant analyse des échantillons en HPLC, tous les extraits méthanoliques sont filtrés à 0,45 µm (filtre Nylon pour seringue 13 mm, MSI).

Les extraits sont analysés à l'aide d'une chaîne HPLC sur une colonne C18 Waters-Novapack (5 µm, 25 cm x 4,6 mm) couplée à un détecteur U.V. (Water 996 Photodiode Array Detector) et à un détecteur de radioactivité (Flo-one β A-500 Packard). Le matériel chromatographique (Waters) est équipé d'un passeur automatique d'échantillons (TM 717 Autosampler) et d'un formateur de gradient (600 E System Controller). Pour l'atrazine, la technique utilisée est la chromatographie de paire d'ions. Les deux solvants, acidifiés avec 5 ml d'acide chlorhydrique 0,2 M contiennent également 5 mM de Dodécylsulfate de sodium pour constituer la paire d'ions. La composition des éluants est la suivante : A, eau (95) et acide chlorhydrique (5) et B, méthanol / eau (90/10). Le programme de gradient est composé de : départ 100 % de A, passage à A / B (62 / 38) à 1 min, jusqu'à 6 min ; 60 / 40 à 8 min ; 40 / 60 à 10 min, jusqu'à 20 min ; 0 / 100 à 30 min ; 100 / 0 à 35 min puis nouvelle injection à 50 min.

II.4.3.c Répartition des résidus non extractibles de l'atrazine dans les fractions de la matière organique

Les fractions considérées sont selon un gradient de polymérisation, les acides fulviques, les acides humiques et l'humine qui correspond à la fraction non extractible de la matière organique. L'atrazine non extractible des échantillons de sol est quantifiée dans les trois fractions de la matière organique. Trois répétitions pour le sol non remanié et trois pour les turricules collectés après 43 jours en microcosmes, sont analysés.

✓ Séparation des acides humiques et fulviques de l'humine

Le sol est tamisé à 2 mm et on ajoute à l'échantillon de sol de 2 g, un volume 30 mL de solution NaOH 0,1 N et 1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Après agitation (1 h) puis centrifugation (15 min à 18000 tours.min⁻¹), on sépare le culot du surnageant. On répète les extractions jusqu'à ce que le surnageant soit nettement moins coloré (marron). Les surnageants d'un même échantillon sont filtrés et regroupés. Ils représentent les argiles et les acides humiques et fulviques.

Pour diminuer son pH, le culot est rincé avec 10 mL d'eau distillée qui sont, après agitation et centrifugation, ajoutés au volume total des surnageants. Le culot représente la fraction non-extractible, l'humine.

✓ Flocculation des argiles

Après mesure du volume total du surnageant, on ajoute du KCl tel que la proportion soit de 1 % (1 g / 100 mL de surnageant, soit ici 1,3 g). La solution est ensuite placée à 4°C pendant 12 h au moins. Les argiles flocculées sont ensuite récupérées par centrifugation (15 min, 12000 tours.min⁻¹) et le culot argile est ajouté au culot de la fraction non extractible, c'est le culot

après extraction alcaline. On comptabilise la quantité d'atrazine dans la fraction non extractible et argiles par comptage à scintillation liquide après combustion CHN (broyer à bille).

La radioactivité présente dans le surnageant, *i. e.* au sein des acides humiques et fulviques est quantifiée par comptage à scintillation liquide (1 mL d'échantillon / 5 mL LS : Hionic -Fluor, Packard ; Comptage : 2*5 min).

✓ Extraction acides humiques – acides fulviques

Une aliquote de 25 mL du surnageant récupéré après extraction alcaline est centrifugé puis acidifié jusqu'à un pH compris entre 1,6 et 2,2 avec de l'HCl 1 N et 0,1 N. L'échantillon est ensuite placé à 4°C pendant 12 h. Après centrifugation (15 min, 18000 tours.min⁻¹) on sépare le culot contenant les acides humiques, du surnageant contenant les acides fulviques. Le culot est rincé avec de l'HCl 0,1 N qui est ajouté aux surnageants dont les volumes sont ajustés à 50 mL. Le ¹⁴C présent en solution dans les acides fulviques est quantifié par comptage à scintillation liquide (1 mL d'échantillon / 5 mL LS : Hionic -Fluor, Packard ; Comptage : 2*5 min). La quantité de radioactivité présente au sein des acides humiques est déduite à partir des quantités contenues dans l'ensemble acides humiques - acides fulviques et dans les acides fulviques.

II.4.4 Analyse des communautés microbiennes

Les analyses des communautés microbiennes ont été réalisées en collaboration avec L'INRA de Dijon.

II.4.4.a Extraction des acides nucléiques

Le sol échantillonné au sein des colonnes sous forme de microsites est séché à température ambiante et les trois répétitions par modalité sont réunies. Le sol est tamisé à 4 mm et trois réplicats de 250 mg (en équivalent sec) dans chaque modalité sont pesés pour l'extraction des acides nucléiques selon la méthode décrite par Martin-Laurent *et al.* (2001).

Les échantillons de sol sont homogénéisés dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) ; EDTA 100 mM (pH 8) ; NaCl 100 mM ; 1 % (wt/vol) polyvinylpyrrolidone ; 2 % (wt/vol) sodium dodecyl sulfate) pendant 30 s à 1,600 rpm dans un broyeur (Mikro-Dismembrator S, B. Braun Biotech International, Germany). Le sol et les débris cellulaires sont enlevés par centrifugation (1 min à 14000 g) et les protéines sont ensuite enlevées par précipitation en ajoutant 1/10^e du volume d'acétate de sodium 5 M, pH 5,5. Après incubation dans la glace pendant 10 min et centrifugation (5 min à 14000 g), le surnageant est récupéré et les acides nucléiques sont précipités en ajoutant un volume identique d'isopropanol (à -20°C), en plaçant le mélange au froid (15 min à -20°C). Après centrifugation le surnageant est éliminé et le culot est lavé soigneusement avec de l'éthanol (70 %). L'ADN du sol est purifié sur colonne de

sépharose 4B. L'extraction d'ADN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et l'ADN est quantifié à 260 nm à l'aide d'un BioPhotomètre (Eppendorf, Hamburg, Germany).

II.4.4.b Analyse des acides nucléiques

✓ Rendement d'extraction

Un rendement d'extraction des acides nucléiques extraits est calculé à partir du dosage des quantités par le biophotomètre et exprimé en mg.g^{-1} de sol sec.

✓ Quantification du ratio ADN / ARN

Les acides nucléiques extraits migrent par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, et les gels sont analysés avec le programme One-DScan 2.03 (Scanalytics program). Les données sont analysées avec le programme ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA) et le rapport ADN / ARN est quantifié par indice de similarité.

✓ RISA

Les Risa (Ribosomal Inter-Space Analysis) sont des analyses de longueur de l'espace inter géniques de l'ADN des ribosomes bactériens 16 S et de l'ADN des ribosomes fongiques 18 S. Ces espaces inter-gènes sont non codant, ainsi ils sont soumis à moins de pression de sélection et sont susceptibles de présenter plus de variations que l'ADN codant. Cette analyse permet donc d'avoir une idée de la diversité bactérienne et fongique du sol.

Les espaces inter géniques de l'ADN ribosomal bactérien 16S-23S sont amplifiés à partir des extraits d'ADN en utilisant les amorces 38r (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') - 72f (5'-TGC GGC TGG ATC TCC TT-3') (Gürtler et Stanisich, 1996). Les réactions sont mises en place dans un volume final de 25 μL avec 25 ng d'ADN du sol, avec 1 μM des amorces spécifiques et 2,5 U du Taq ADN polymérase (Appligene Oncor, France). Les PCR (Polymerase Chain Reaction) sont effectuées dans un PTC 200 gradient cyler (MJ Research, Waltham, Mass.) en utilisant le programme suivant 5 min à 94°C, 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, et 2 min à 72°C, plus un cycle supplémentaire de 15 min à 72°C. 8 μL d'aliquotes sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 6 % pendant 17 h à 16 mA. Les gels sont révélés avec du SYBR green II (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) selon le protocole de Martin-Laurent *et al.*, (2001). Les profils RISA sont analysés avec le programme One-DScan 2.03 (Scanalytics program). Les matrices de covariance déduites des gels (présence-absence et intensité relative de chaque bande) sont analysées en analyse de composantes principales (ACP).

✓ Quantification du nombre de copies des gènes dégradant l'atrazine AtzA, B et C

Des PCR quantitatives sont effectuées avec un Smart Cycler (Cypheid, USA) en utilisant le Smart Kit pour Sybr Green I conformément aux recommandations du fabricant (Eurogentec, Belgium).

25 ng de l'ADN du sol sont utilisés pour la PCR quantitative en temps réel effectuée sur un volume final de 25 µL en présence de 0,625 µg de produit T4 Gene 32 (Qbiogene, UK). Les conditions d'amplification suivent le protocole suivant : 95°C 600 sec ; 45 cycles de 15 sec à 95°C ; 15 sec à 60°C ; 15 sec à 72°C suivies d'un cycle de mélange effectué de 60°C à 95°C en augmentant la température de 0,2°C par sec.

Les amorces spécifiques des gènes pour l'amplification de atzA (Afor/Arev), atzB (Bfor/Brev) et atzC (Cfor/Crev) sont : Afor 5'-ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC-3', Arev 5'-CAC CCA CCT CAC CAT AGA CC-3', Bfor 5'-AGG GTG TTA GGT GGT GAA C-3', Brev 5'-CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA-3', Cfor 5'-GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA-3' et Crev 5'-TCC CCC AAC TAA ATC ACA GC-3'. La PCR en temps réel est calibrée en amplifiant une série de dilution de la séquence spécifique cible clonée (de 10⁸ à 10¹ copies). Les courbes de calibration mettant en relation le log du nombre de copies du gène cible en fonction du Ct (cycle seuil) sont déterminées par la relation $\log(\text{atzA}) = -3,86 \times \text{Ct} + 41,6$ (R^2 0,997) ; $\log(\text{atzB}) = -3,54 \times \text{Ct} + 40,4$ (R^2 0,981) et $\log(\text{atzC}) = -3,48 \times \text{Ct} + 38,9$ (R^2 0,996).

II.5 Traitements statistiques

L'ensemble des traitements statistiques réalisés dans ce travail relève des comparaisons multiples. Cette procédure consiste à comparer deux à deux l'ensemble ou une partie des résultats (Sokal et Rohlf, 1981).

En non paramétriques sont utilisés : les tests de Mann-Whitney pour comparer les échantillons 2 à 2 et de Kruskal-Wallis pour comparer les échantillons 2 à 2 et l'ensemble des échantillons.

Des ANOVA, à un facteur contrôlé et des ANOVA en Modèle Linéaire Généralisée (GLM) sont également utilisées pour tester la réponse des variables respectivement à un facteur et à plusieurs facteurs en testant leurs interactions.

Une ACP est effectuée pour caractériser les communautés bactériennes analysées des microsites de sol par RISA.

Le risque d'erreur est fixé à 5 % quel que soit le test utilisé. L'ensemble des tests statistiques a été effectués avec le logiciel Minitab, 13,31 à l'exception de l'ACP réalisée avec le logiciel ADE-4.

**CHAPITRE III INDICATEURS DES DISPOSITIFS
EXPERIMENTAUX AUX DIFFERENTES ECHELLES
D'INVESTIGATION : MICROSITES, MICROCOSMES ET
MESOCOSMES**

Les indicateurs biologiques, interviennent dans la validité des résultats observés qui sont présentés par la suite. Ils sont les témoins du fonctionnement des sols au cours de nos expérimentations au sein de microsites, en colonnes de sol ou microcosmes et au terrain en mésocosmes.

III.1 Activité biologique du sol

Au cours de cette partie, les quantités de carbone respirées en présence ou en absence de vers et / ou en présence et en absence d'atrazine seront comparées, de façon à déterminer leurs influences respectives sur l'activité minéralisatrice du carbone.

III.1.1 Activité respiratoire au sein de microsites de sol

La minéralisation du carbone du sol pour les microsites de sol collectés à partir des microcosmes est présentée en figure III.1. L'âge des microsites, lors de la seconde application d'atrazine est celui des temps d'incubation des microcosmes *i. e.* 11, 21, 32, 40, 50 et 62 jours. Quelle que soit l'âge des microsites, au terme de l'incubation, les turricules minéralisent des quantités totales de carbone supérieures aux autres microsites. Les galeries de 11 à 30 jours minéralisent des quantités de carbone équivalentes au sol non remanié. A 40 et 50 jours, elles minéralisent des quantités de carbone proches des turricules et supérieures au sol non remanié en présence et en absence de vers. Après 40 et 50 jours, dans les turricules et les galeries, la respiration est supérieure aux autres dates, (voir tableau III et expression des taux de carbone minéralisé / jour / g de sol sec). Pour le sol non remanié, les quantités minéralisées sont proches entre les différents horizons et aucune tendance ne se distingue.

Quelle que soit l'âge des microsites, les quantités expirées après 26 à 29 jours d'incubation sont inférieures à 3,5 mg /10 g sol sec, à l'exception des turricules 11 jours (figure III.1-a). Les turricules de 11 jours minéralisent au moins 2,3 fois plus de carbone (11,9 mg /10 g sol sec) que les autres microsites, après 26 jours.

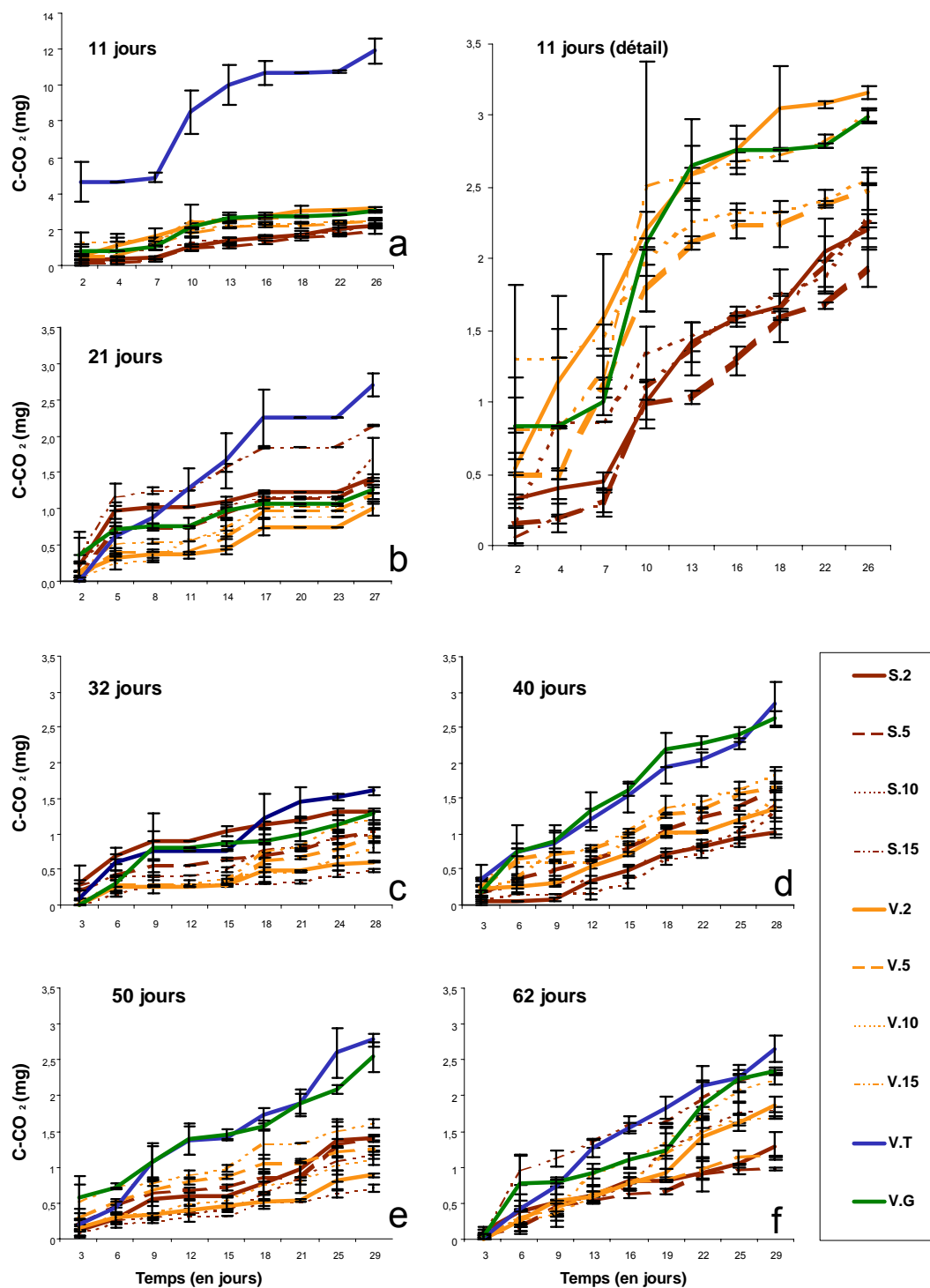


Figure III.1 Cinétique de minéralisation du carbone total dans les microsites de sol échantillonnés à 11, 21, 32, 40, 50, 62 jours à partir des microcosmes sans vers (S.2, S.5, S.10, S.15) et des microcosmes avec vers (V.2, V.5, V.10, V.15, V.T, V.G), (Exp. 2). Les barres indiquent les erreurs standards.

III.1.2 Activité respiratoire en microcosmes

Au cours des Exp. 1 et 2, au laboratoire, les colonnes de sol sont reconstituées respectivement avec du sol réhumecté et du sol frais. Les quantités cumulées de carbone minéralisé au cours des 86 jours d'incubation (Exp. 1) et des 62 jours d'incubation (Exp. 2) sont représentées en figure III.2 et III.3 en mg C / 24^h / microcosmes.

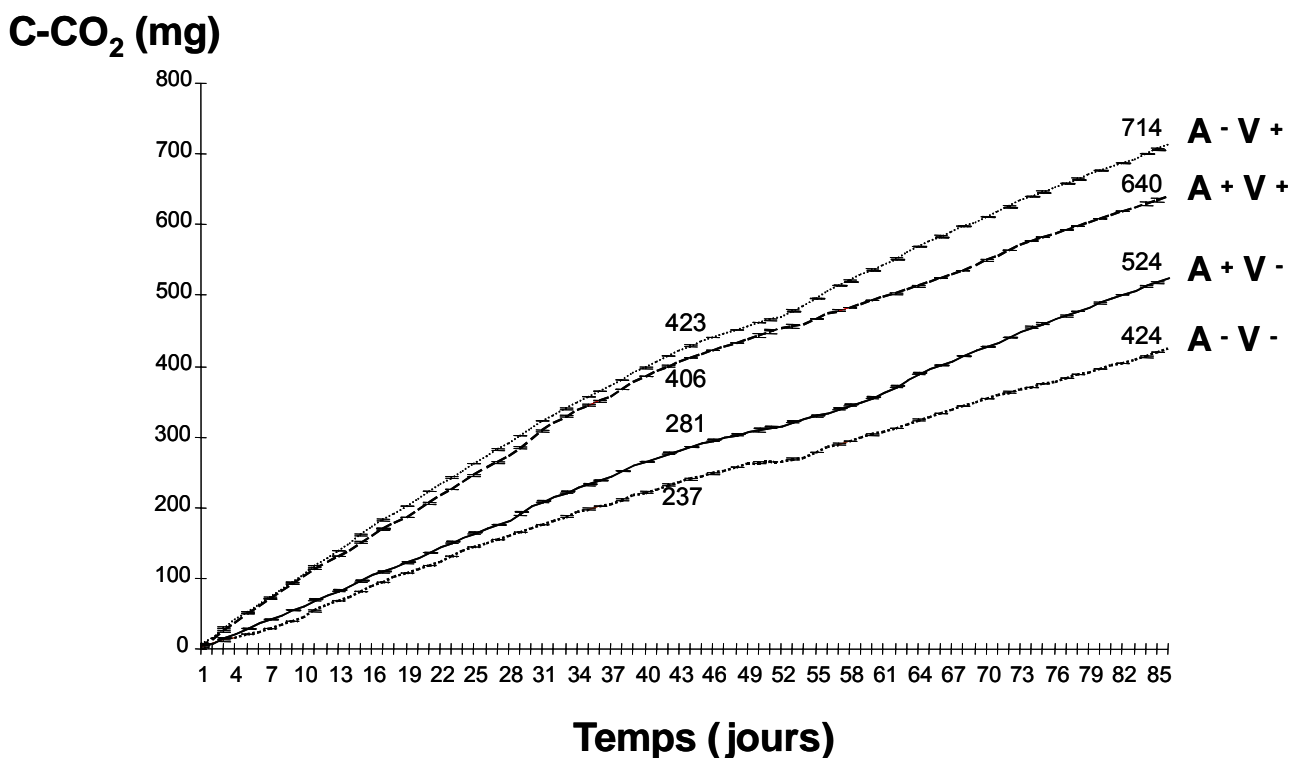


Figure III.2 Cinétique de minéralisation du carbone total en microcosmes (Exp. 1), avec atrazine et vers (A⁺ V⁺), avec atrazine sans vers (A⁺ V⁻), sans atrazine avec vers (A⁻ V⁺), sans atrazine ni vers (A⁻ V⁻), au cours de l'incubation. Les quantités totales de carbone minéralisées après 43 et 86 jours sont indiquées et les barres indiquent les erreurs standards.

Les cinétiques de minéralisation ont un déroulement similaire au cours de l'incubation mais elles sont significativement différentes en termes de quantités de CO₂ respirées.

En absence de vers, l'apport d'atrazine augmente la respiration. Pour l'Exp. 1, (A⁻ V⁻ versus A⁺ V⁻), l'écart de 19 % à 43 jours, s'accroît à 24 % après 86 jours d'incubation.

La respiration est également supérieure en présence de vers. En absence d'atrazine (Exp. 1), la différence de carbone expiré atteint + 79 % après 43 jours puis décroît légèrement (+ 68 %) en fin d'incubation (A⁻ V⁻ vs A⁻ V⁺). Avec atrazine, (A⁺ V⁻ versus A⁺ V⁺), l'effet des vers sur la minéralisation du carbone total est 3 fois moindre dans l'Exp. 1 : + 44 % à 43 jours et + 22 % à

86 jours. Pour l'Exp. 2 l'écart entre les modalités avec et sans vers est de + 62 % après 62 jours d'incubation. Au cours de l'incubation il s'accroît jusque 84 % (22 jours) puis diminue.

Pour l'Exp. 1, les vers et l'interaction vers-atrazine ont une influence sur la respiration du sol mais pas le facteur atrazine (ANOVA, à 86 j, atrazine $f = 0,01$, $p = 0,911$; vers $f = 22,78$, $p = 0,001$, et interaction atrazine x vers $f = 8,75$, $p = 0,018$). Pour l'Exp. 2, les vers et la durée de l'incubation ont une influence sur la respiration du sol mais pas l'interaction entre les facteurs vers et durée d'incubation (Modèle Linéaire Généralisé, à 174 j, vers $f = 40,00$, $p = 0,000$; durée d'incubation $f = 17,01$, $p = 0,000$, et interaction vers x durée d'incubation $f = 2,53$, $p = 0,057$). Les calculs de quantité de C-CO₂ dégagé par le sol par jour et par gramme de sol sec sont présentés dans le tableau III.1.

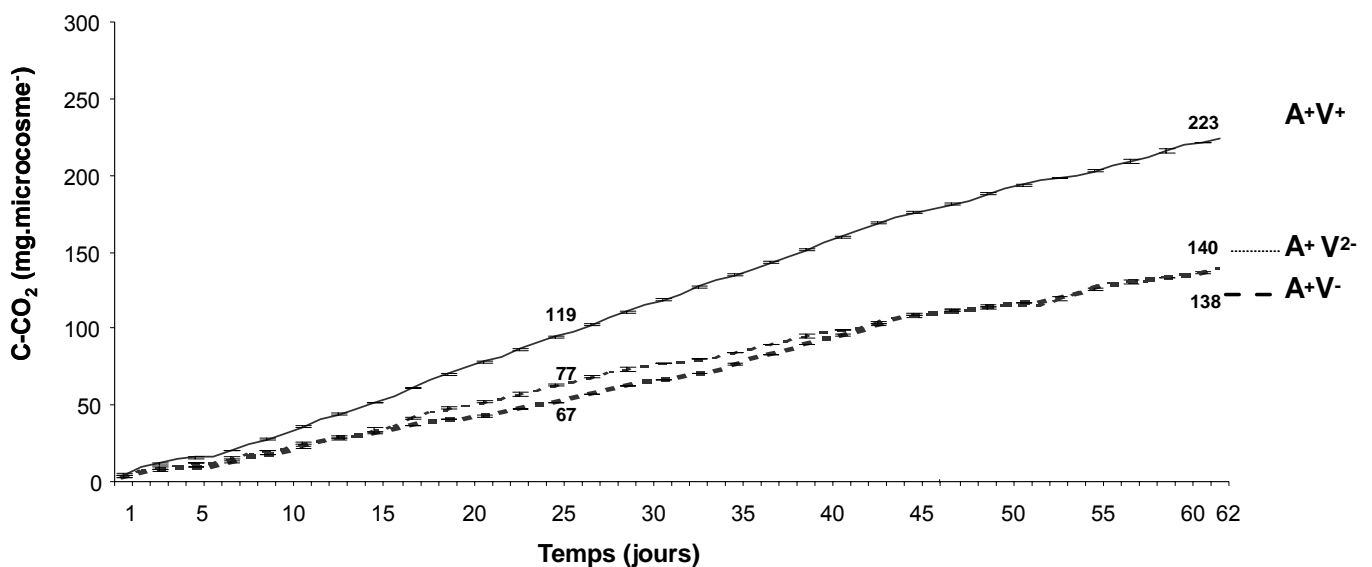


Figure III.3 Cinétique de minéralisation du carbone total en microcosmes au cours de l'incubation (Exp. 2), en présence d'atrazine, avec vers (A⁺ V⁺), sans vers avec enfouissement de la litière dans une fausse galerie (A⁺ V⁻), sans vers avec enfouissement de la litière sur toute la surface de la colonne. Les quantités totales de carbone minéralisées après 31 et 62 jours sont indiquées et les barres indiquent les erreurs standards.

Les courbes, linéaires en début d'incubation, présentent un infléchissement vers le 40^e et le 45^e jour d'incubation, respectivement pour l'Exp. 1 et 2. Ce ralentissement traduit une diminution progressive de la respiration avec l'allongement de la durée d'incubation, diminution particulièrement marquée en présence de vers.

Dans l'Exp. 2, la modalité sans vers A⁺ V⁻² (enfouissement de la litière sur toute la surface de la colonne) ne présente pas de différence avec la modalité sans vers A⁺ V⁻ (enfouissement de la litière dans une fausse galerie) en ce qui concerne les quantités de C-CO₂ expirées au cours de l'incubation (Mann-Whitney U-test, 95%, à 20 jours, $n = 15/5$, $p = 0,1378$; à 31 jours, $n = 12/4$,

$p = 0,5853$). Les deux types d'enfouissement de la litière n'entraînent pas de respiration différente.

Les dynamiques de minéralisation du carbone total sont représentées en annexe 2 et 3. Les apports de litière sont le plus souvent suivis d'une augmentation de la minéralisation pour les microcosmes avec vers ($A^- V^+$ et $A^+ V^+$). Aucune influence des apports de litière n'est visible pour les modalités sans vers ($A^- V^-$ et $A^+ V^-$).

III.1.3 Activité respiratoire du sol, au terrain, en mésocosmes

Les quantités cumulées de carbone minéralisé au cours des 174 jours d'incubation, au cours de l'Exp. 4, au terrain, en mésocosmes sont représentées en $g / 24^H / \text{mésocosme}$ sur la figure III.4, en présence d'atrazine et avec vers et avec vers.

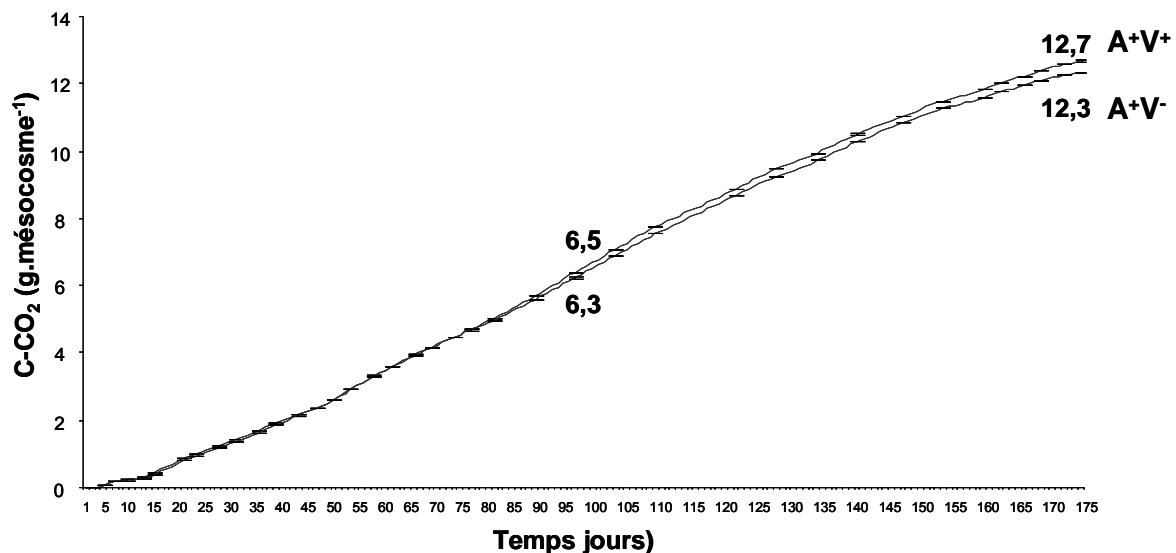


Figure III.4 Cinétique de minéralisation du carbone total en mésocosmes, au terrain (Exp. 4) en présence d'atrazine, avec vers ($A^+ V^+$), sans vers ($A^+ V^-$) au cours du temps. Les quantités totales de carbone minéralisées après 87 et 174 jours sont indiquées et les barres indiquent les erreurs standards.

Les cinétiques de minéralisation représentées ont une évolution similaire. L'écart entre les quantités respirées est inférieur à 10 % au cours des 20 premiers jours, puis inférieur à 5 % à partir du 30^e jour. Les quantités respirées sont similaires + 2,8 % après 174 jours ($A^+ V^-$ vs $A^+ V^+$). Elles ne présentent pas de différence significative, (Kruskal-Wallis, 95%, à 174 jours $n = 6$, $p = 0,337$). Les quantités de C-CO₂ dégagées par le sol par jour et par gramme de sol sec sont représentées dans le tableau III.1 et les quantités de carbones minéralisées en g par jour sont représentées en annexe 5.

A la différence des microcosmes, les mésocosmes ne sont pas incubés à température constante de 12°C mais soumis aux variations climatiques du terrain (précipitation en annexe 4). Les courbes sont linéaires en début d'incubation, et présentent un léger ralentissement une 100^e de jour après l'application d'atrazine, début août.

III.1.4 Activité respiratoire des lombriciens

De façon à s'affranchir des différences de biomasse de vers de terre entre les microcosmes des modalités A^-V^+ et A^+V^+ de l'Exp. 1, les quantités de carbone minéralisées liées aux vers (obtenues respectivement par différence $A^-V^+ - A^-V^-$ et $A^+V^+ - A^+V^-$) sont rapportées à la biomasse lombricienne correspondante (figure III.5). La minéralisation de carbone liée aux vers ralentit avec l'allongement de l'incubation : sans atrazine, elle croît légèrement alors qu'elle devient nulle à partir du 55^e jour en présence d'atrazine. Elle est supérieure de 53 %, en absence d'atrazine, au terme des 86 jours d'incubation.

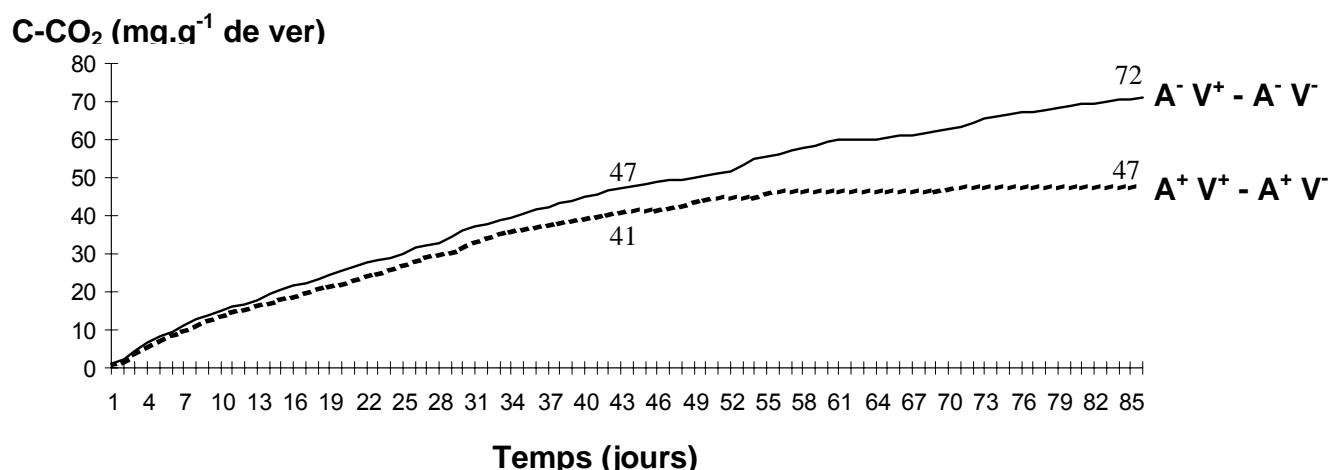


Figure III.5 Respiration spécifique des vers en microcosmes, au laboratoire (Exp. 1) en présence d'atrazine ($A^+V^+ - A^+V^-$) et en absence d'atrazine ($A^-V^+ - A^-V^-$) au cours du temps. Les quantités totales de carbone minéralisées après 43 et 86 jours sont indiquées.

Au cours de l'Exp. 2, l'expression de la quantité de carbone minéralisée liées aux vers et exprimées par gramme de ver, augmente avec le temps d'incubation (figure III.6).

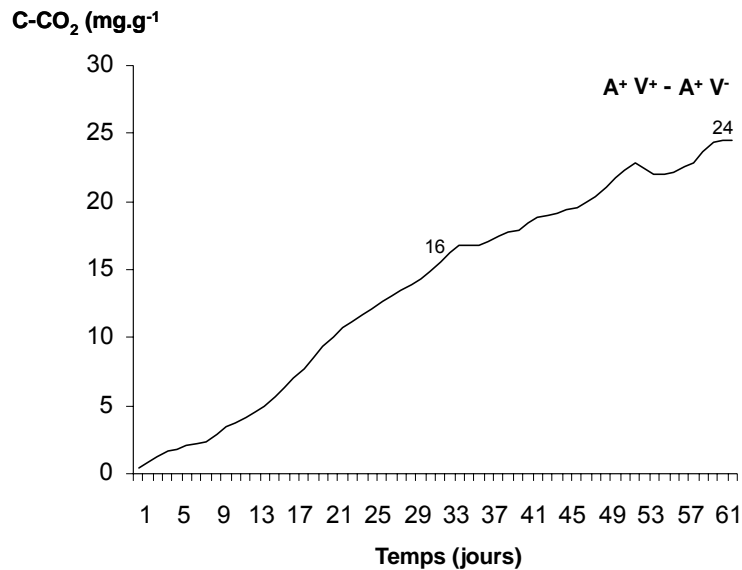


Figure III.6 Respiration spécifiques des vers en microcosmes, au laboratoire (Exp. 2) en présence d'atrazine (A⁺ V⁺ - A⁺ V⁻) au cours du temps. Les quantités totales de carbone minéralisées après 31 et 62 jours sont indiquées.

C-CO₂ (mg.g⁻¹ de ver)

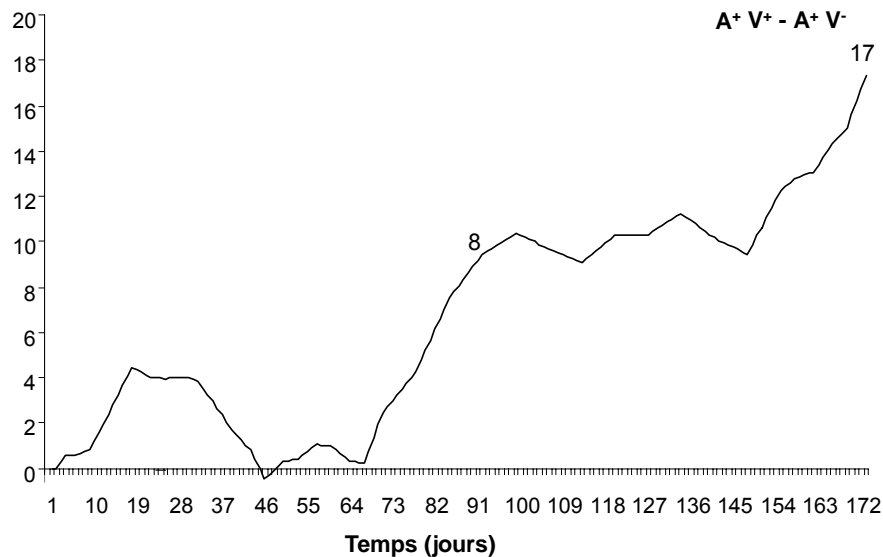


Figure III.7 Respiration spécifiques des vers en mésocosmes, au terrain (Exp. 4) en présence d'atrazine (A⁺ V⁺ - A⁺ V⁻) au cours du temps. Les quantités totales de carbone minéralisées après 87 et 174 jours sont indiquées.

Au terrain, en mésocosmes (Exp. 4), cette quantité est en relation avec les conditions climatiques (température et humidité) (annexe 4) (figure III.7).

RESUME : Les expérimentations à différentes échelles d'investigation (microsites – microcosmes – mésocosmes) permettent de souligner les effets de l'apport d'atrazine et des vers sur l'activité minéralisatrice du carbone dans le sol. Malgré les différences notées le facteur atrazine n'augmente pas significativement l'activité minéralisatrice du sol (Exp. 1). En présence de vers la respiration est également supérieure mais cet effet est atténué en présence d'atrazine. D'autre part l'activité minéralisatrice du sol est supérieure dans les microsites turrucules et galeries mais cette augmentation en fonction de l'origine du sol s'atténue avec le temps (Exp.2). Avec l'augmentation de la taille des dispositifs les différences observées sont atténuées. Les quantités de carbone minéralisées (exprimées en $\mu\text{g.jour}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de sol) et les pourcentages d'augmentation en présence de vers sont répertoriés dans le tableau III.1 en lien avec les caractéristiques des expérimentations.

Tableau III.1 : Quantités de carbone minéralisées ($\mu\text{g C} / 24\text{H} / \text{g}$ de sol sec), durée et température d'incubation, conditionnement du sol, et échelle d'investigation, au cours des expérimentations

Echelle	Durée (jours)	Total minéralisé en		Ecart V ⁻ / V ⁺ (pourcentage)	Sol (éq. sec)	
		µg C / 24 ^H / g de sol sec			Température	
		Sans Vers	Avec Vers			
Microsites	26 j- âge : 11 j-	S.0 : 8,45	V.T : 45,82 V.G : 11,53	+ 442 % + 37 %	10 g de sol Sol frais 20°C	
	27 j- âge : 21 j-	S.0 : 5,27	V.T : 10,02 V.G : 4,71	+ 90 % - 11 %		
	28 j- âge : 32 j-	S.0 : 4,70	V.T : 5,72 V.G : 4,60	+ 22 % - 2 %		
	28 j- âge : 40 j-	S.0 : 3,62	V.T : 10,12 V.G : 9,38	+ 180 % + 159 %		
	29 j- âge : 50 j-	S.0 : 4,89	V.T : 9,59 V.G : 8,77	+ 96 % + 80 %		
	29 j- âge : 62 j-	S.0 : 4,47	V.T : 9,15 V.G : 8,05	+ 105 % + 80 %		
	Microcosmes	86 j-	A ⁻ : 3,25 A ⁺ : 4,01	A ⁻ : 5,46 A ⁺ : 4,89	+ 68 % + 22 %	1520 g de sol Sol réhumecté 12°C
			Ecart A ⁻ / A ⁺		+A : + 23 % +A : - 10 %	
Microcosmes			62 j-	1,47 2,37	+ 62 %	1520 g de sol Sol frais 12°C
Mésocosmes	174 j-	1,41	1,44	+ 2,8 %	50400 g de sol Sol frais Temp. extérieure	

III.2 Effet de l'atrazine sur la biologie et l'activité des lombriciens

Pour contrôler l'effet de l'atrazine sur les lombriciens dans nos microcosmes, différents indices biologiques sont suivis : la biomasse et des indices d'activité.

En fin d'incubation les vers sont pesés pour déterminer les gains ou les pertes de masse.

Les indices d'activités des lombriciens sont également des témoins de leur état physiologique dans les dispositifs expérimentaux. L'activité fouisseuse des lombriciens se traduit par l'enfouissement de litière, quantifié en disparition de litière en surface, et par la quantité de turricules émis en surface, pour l'espèce *Lumbricus terrestris* essentiellement. La reproduction des lombriciens est un autre indice d'activité quantifié avec le nombre de cocons et de juvéniles retrouvés au moment de la déstructuration des microcosmes.

III.2.1 Evolution de la biomasse lombricienne

Le suivi de la biomasse lombricienne est réalisé à l'issu des deux expérimentations où un suivi de la minéralisation de l'atrazine a été effectué (Exp. 1 et 2).

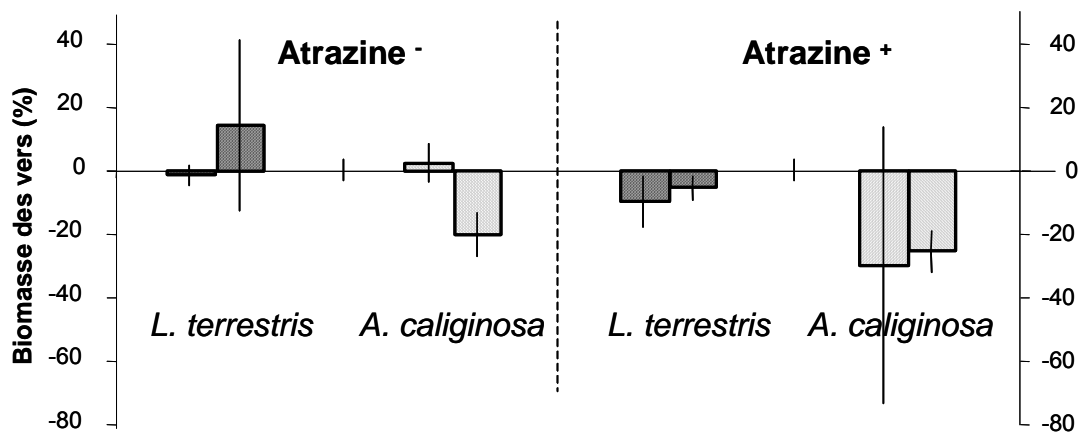


Figure III.8 Effet de l'atrazine sur la variation de masse (en % de la masse initiale) des espèces *L. terrestris* et *A. caliginosa* après respectivement 43 et 86 jours d'incubation au cours de l'Exp. 1. Les barres indiquent les erreurs standards.

Aucun effet délétère de l'atrazine n'a été observé sur l'évolution de la biomasse lombricienne.

Pour l'Exp. 1, en présence d'atrazine, on observe une diminution moyenne de la biomasse de 17 % et 12 % respectivement à 6 et 12 semaines (figure III.8). Cependant les biomasses ne sont significativement différentes entre les modalités avec et sans atrazine (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 3$, à 43 jours, $p = 0,3827$, à 86 jours, $p = 1,000$). L'atrazine semble avoir un effet supérieur sur la biomasse des vers au cours des six premières semaines d'incubation. Pour l'Exp. 2 (figure III.9), la biomasse totale des vers de terre augmente significativement entre le début et la fin d'incubation ($3,38 \pm 0,06$ vs $3,59 \pm 0,14$), (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 18$, $p = 0,0279$). En considérant chaque date de déstructuration, seuls les vers de terre des microcosmes déstructurés après 32 et 40 jours présentent une diminution de la biomasse totale (-5 %). Cette diminution de biomasse est essentiellement due à un individu d'une répétition. Sans atrazine la biomasse totale des vers reste stable quel que soit le temps d'incubation. Les gains et pertes de masse des deux espèces (gain pour *L. terrestris* avec une grande variabilité et perte pour *A. caliginosa*) au sein du traitement témoin se contrebalancent et ainsi la biomasse globale des microcosmes apparaît équivalente sur les 86 jours d'incubation.

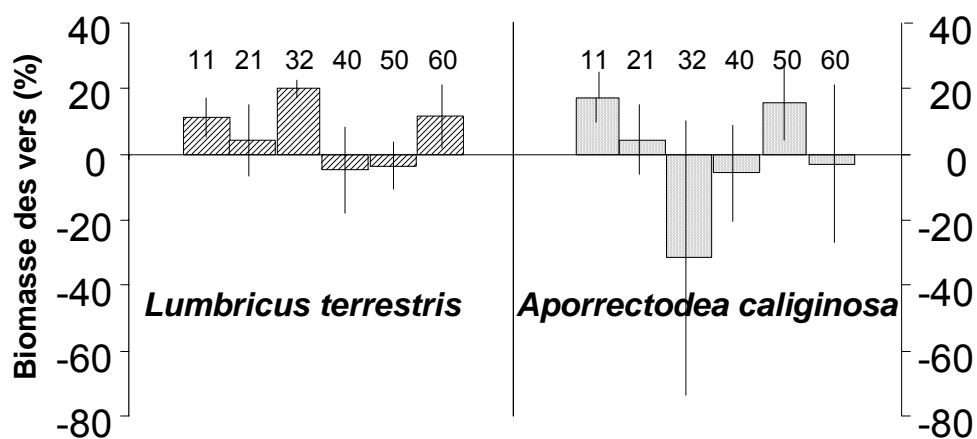


Figure III.9 Effet de l'atrazine sur la variation de masse (en % de la masse initiale) des espèces *L. terrestris* et *A. caliginosa* après 10, 20, 32, 40, 50 et 62 jours d'incubation, au cours de l'Exp. 2. Les barres indiquent les erreurs standards.

Si on considère les deux espèces, l'anécique *L. terrestris* est moins affectée en biomasse que l'endogé *A. caliginosa* (- 10 et - 6 % versus - 30 et - 26 %, après 43 et 86 jours d'incubation, respectivement (Exp. 1, figure III.8). Pour l'Exp. 2 (figure III.9), aucune différence n'est notée pour *L. terrestris* (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 18$, $p = 0,1687$) ni pour *A. caliginosa* (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 36/35$, $p = 0,3575$). Aucune mortalité n'est observée pour *L. terrestris* contrairement à *A. caliginosa* : deux et un individus sont retrouvés morts après 86 jours d'incubation (Exp. 1) et après 62 jours d'incubation (Exp. 2). Au cours des expérimentations nous avons pu observer que la mort d'individus *A. caliginosa* est souvent suivie d'un gain de masse pour l'individu *L. terrestris*.

III.2.2 Indices d'activités mécaniques des lombriciens : litière, turricules et cocons

Au cours de l'Exp. 1, la consommation de litière ($6,8 \pm 0,7 \text{ mg.j}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de ver), la production de turricules en surface ($0,18 \pm 0,02 \text{ g.j}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de ver), la reproduction (présence de cocons de juvéniles nouvellement éclos) n'étaient pas affectées de manière significative par leur exposition à l'atrazine (tableau III.2).

Tableau III.2 Réponse des vers à l'application d'atrazine mesurée par l'enfouissement de litière, la production de turricules et la reproduction après 43 et 86 jours d'incubation (Exp. 1).

	Enfouissement de litière (mg / jour /g de vers)		Production de turricules (g)		Reproduction (cocons + juvéniles)	
	43 jours (n = 3)	86 jours (n = 3)	43 jours (n = 6)	86 jours (n = 3)	<i>L. terrestris</i>	<i>A. caliginosa</i>
Atrazine⁺	4,98 \pm 0,65 (a)	9,20 \pm 1,02 (a)	31,56 \pm 4,65 (a)	56,99 \pm 5,78 (a)	8 C	9 C + 1 J
Atrazine⁻	5,35 \pm 1,46 (a)	7,53 \pm 0,83 (a)	28,58 \pm 2,76 (a)	42,81 \pm 9,54 (a,b)	9 C	12 C

Des lettres différentes au sein d'un même colonne indiquent une différence statistique, ($p = 0,05$) selon le test U, Mann-Whitney.

Indépendamment de l'application d'atrazine, la consommation journalière de litière par ver et par jour augmente significativement avec le temps d'incubation (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, $p = 0,0131$). De même la production de turricules augmente sans que les différences notées soient significatives (163 mg vs $191 \text{ mg.jour}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de ver à 43 jours et 86 jours respectivement ; Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, $p = 0,5752$).

Au cours de l'Exp. 2, la production de turricules par jour et par gramme de vers est équivalente d'une récolte à l'autre malgré une production supérieure pour les microcosmes déstructurés après 21 jours d'incubation (tableau III.3). La présence de cocons et de juvéniles de l'espèce endogée *A. caliginosa* témoigne de la survie et de la reproduction des vers de terre.

Tableau III.3 Indices d'activité biologiques des vers : production de turricules et reproduction aux différents temps d'incubation (Exp. 2).

Temps d'incubation	Production de turricules (mg / jour / g de vers)		Reproduction (cocons + juvéniles)	
			<i>L. terrestris</i>	<i>A. caliginosa</i>
11 jours	46,6 ± 8,6	(a)	/	/
21 jours	118,5 ± 28,6	(a)	/	1 J
32 jours	69,8 ± 28,3	(a)	/	/
40 jours	89,9 ± 9,8	(a)	/	1 C + 1 J
50 jours	72,7 ± 28,6	(a)	/	1 C + 2 J
60 jours	70,5 ± 9,4	(a)	/	/

Des lettres différentes au sein d'un même colonne indiquent une différence statistique, (p = 0,05) selon le test U, Mann-Whitney.

RESUME : l'atrazine n'affecte pas l'évolution pondérale des vers de terre. Une tendance à la diminution de biomasse est observée après 43 et 86 jours d'incubation (respectivement 17 % et 12 %). Les pertes de biomasse ne sont toutefois pas significativement différentes entre les traitements avec et sans atrazine. Pour l'Exp. 2, la biomasse totale des lombriciens augmente significativement entre le début et la fin d'incubation. L'espèce *A. caliginosa* est plus touchée que *L. terrestris* en perte de biomasse et en mortalité.

L'enfouissement de litière, la production de turricules et la reproduction ne sont pas affectés par la présence d'atrazine. La consommation de litière a tendance à augmenter avec l'allongement de la durée d'incubation.

III.3 Discussion

III.3.1 Influence de l'atrazine

En microcosmes, l'activité respiratoire du sol est augmentée de 24 % après application d'atrazine. L'utilisation de l'atrazine comme source de carbone par les micro-organismes du sol a été démontrée par divers travaux (Bekhi et Khan, 1986 ; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Radosevich *et al.*, 1995 ; Struthers *et al.*, 1998). Elle pourrait expliquer cet accroissement de carbone minéralisé. Cependant, la quantité d'atrazine apportée par microcosme (0,7 mg soit 0,26 mg de carbone) est trop faible pour expliquer le surplus de carbone respiré (+ 94 mg / 86 jours). L'atrazine est également utilisée comme source d'azote par les micro-organismes (Cook et Hütter, 1981 ; Cook, 1987 ; Mandelbaum *et al.*, 1993 ; Radosevich *et al.*, 1995 ; Struthers *et al.*, 1998). Les travaux de Alvey et Crowley (1995) et Houot *et al.* (1998) montrent que l'activité des micro-organismes du sol mesurée par l'expiration de CO₂ et la minéralisation d'atrazine marquée sur le noyau sont indépendantes. A l'évidence, l'origine du surplus de carbone minéralisé provient de la matière organique du sol et / ou de la litière apportée. Ceci traduit donc que l'application d'herbicide conduit à une augmentation de l'activité minéralisatrice du carbone par les micro-organismes. Une stimulation des micro-organismes du sol après un apport de l'herbicide 2,4D a été obtenue alors que des apports répétés de cet herbicide conduisent au phénomène inverse *i. e.* une diminution de l'activité microbienne probablement liée à la toxicité des métabolites de dégradation (Prado et Airoidi, 2000). Andrea *et al.* (2000) montrent pour différentes molécules de pesticides que la réponse des communautés microbiennes du sol (réponse enzymatique et biomasse microbienne) est nette mais transitoire. Un usage à long terme (20 ans) de l'atrazine en sols cultivés altère la composition de la communauté microbienne méthanotrophe sans en modifier ni son abondance sa fonction d'oxydation du méthane. (Seghers *et al.*, 2003).

III.3.2 Influence des lombriciens

Quelle que soit l'échelle d'investigation, la présence de lombriciens augmente également la respiration du sol en présence ou non d'atrazine : au terrain en mésocosmes (+ 3 %), au

laboratoire en microcosmes avec du sol réhumecté en absence (+ 68 %) et en présence (+ 22 %) d'atrazine ; au laboratoire en microcosmes avec du sol frais (+°62 %).

Le surplus respiratoire lié aux vers s'atténue avec l'accroissement des échelles d'étude et ceci de façon non linéaire (*microsite*, $\approx 4 \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ sol sec – *microcosme* $\approx 1 \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ sol sec – *mésocosme* $\approx 0,05 \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ sol sec). Plus l'échelle des dispositifs est multipliée, plus l'effet des lombriciens sur l'activité minéralisatrice du sol est dilué. Ceci souligne l'hétérogénéité des réponses biologiques en fonction des échelles d'investigation .

Différents travaux (Cortez *et al.*, 1989 ; Haimi et Huhta, 1990 ; Haimi et Einbork, 1992 ; Zhang et Hendrix, 1995 ; Binet *et al.*, 1998) montrent qu'à court terme, la présence de vers (toutes espèces confondues) contribue à augmenter la minéralisation du carbone. Ceci est dû au **métabolisme propre du ver** et à la **stimulation microbienne** par l'activité lombricienne (Satchell, 1967 ; Binet *et al.*, 1998).

La respiration moyenne des vers calculée, en absence d'atrazine, pour les deux espèces conjointes atteint 0,84 mg C-CO₂/ jour / g de ver. Cette valeur est supérieure à celles rapportées par la littérature : 0,76 mg pour *L. terrestris* et 0,77 mg pour *A. caliginosa* (Byzova, 1965) et 0,64 mg pour *L. terrestris* (Binet *et al.*, 1998). Ceci pourrait être dû au fait que les individus *L. terrestris*, globalement responsables de la majeure partie de l'activité respiratoire détectée, étaient tous juvéniles dans notre expérimentation.

La stimulation microbienne en présence de vers, se traduit par l'augmentation de la respiration dans les microsites de sol créés par les vers, les galeries et les turricules. Une respiration stimulée du sol a été observée dans les parois de galeries (Binet, 1993 ; Tiunov et Scheu, 1999) et les turricules (Tiunov et Scheu, 2000b) L'activité de la macrofaune lombricienne conduit à un rajeunissement des populations microbiennes, à une plus forte mobilisation des nutriments microbiens et donc à une stimulation de l'activité microbienne (Coleman *et al.*, 1983). Les turricules et galeries sont enrichis en carbone (turricules : Tiwari *et al.*, 1989 ; Binet, 1993 ; Zhang *et al.*, 2003 ; galeries : Binet, 1993 ; Fegél *et al.*, 1998), en carbone issu de la litière (Jégou, 1998) surtout pour *Lumbricus terrestris* et dans des proportions moindres pour *Apporectodea caliginosa*. Ces microsites sont aussi enrichis en azote (turricules : Lunt et Jacobson, 1945 ; Parle, 1963b ; Tiwari *et al.*, 1989, Binet, 1993 ; Zhang *et al.*, 2003 ; galeries : Binet, 1993). Les turricules ont en général une diversité et des quantités de micro-organismes plus importantes que le sol non remanié (Parle, 1963a ; Shaw et Pawluk, 1986a ; Scheu, 1987 ; Tiunov et Scheu, 2000a,b) de même que les galeries (Tiunov et Dobrovolskaya, 2002 ; Tiunov et Scheu, 1999). La stimulation microbienne observée en présence de vers serait due à une utilisation de ces substances nutritives supplémentaires (produits de sécrétion et d'excrétion) que les invertébrés apportent (Lee, 1985). Scheu *et al.* (2002) précisent cette hypothèse en observant que la présence de vers diminue l'activité catabolique réelle des micro-organismes

par compétition pour la ressource. En revanche les lombriciens stimulent l'activité potentielle des microorganismes en optimisant leur utilisation de la ressource. Les auteurs observent ainsi une réponse plus rapide de la communauté microbienne au « pulse » de ressource et une exploitation plus efficace des nouvelles ressources.

III.3.3 Influence croisée de l'atrazine et des lombriciens

La minéralisation du carbone attendue dans un sol en présence des deux facteurs "vers" et "atrazine" devrait être supérieure à celle d'un sol où seulement l'un des deux facteurs s'exprime. Mais nos observations au laboratoire, en microcosmes (Exp. 1, sol sec réhumecté), ont montré que le sol inoculé avec des vers respirait davantage en absence qu'en présence d'atrazine (714 mg *versus* 640 mg, en 86 jours). La différence de biomasse lombricienne entre les deux modalités " avec atrazine " *versus* " sans atrazine " pouvant être responsable de ce phénomène, nous nous en sommes affranchis en exprimant la respiration par unité de biomasse de vers (g de ver). La minéralisation du carbone alors supérieure de 34 % après 86 jours en absence d'atrazine, confirme les précédents résultats. Il y a bien un effet atrazine sur les vers qui se traduit par une diminution de leur activité respiratoire et une tendance à la diminution de leur biomasse.

Si l'on considère la respiration spécifique des vers (figure III.5, III.6, III.7), elle diminue mais elle ne peut toutefois être nulle sans mortalité de ces derniers. Aussi la stagnation de "l'effet vers" dans Exp. 1 (figure III.5) à partir de 55 jours peut n'être qu'apparent : une respiration de la microflore du sol différente et probablement plus élevée en absence de vers qu'en leur présence, masquerait la respiration des vers. Au contraire dans Exp. 2, la respiration liée aux vers augmente régulièrement sans plateau. L'artéfact expérimental lié à l'utilisation de sol réhumecté (Exp. 1) pourrait expliquer la différence entre Exp 1 et Exp 2 : La réhumectation brusque du sol constitue un stress qui conduit à une sur-activité des micro-organismes (flush microbien) (Binet, 1993). La respiration du sol A⁺ V⁻ est supérieure dans l'Exp. 1 (sol réhumecté) par rapport à l'Exp. 2 (sol frais) : 4,0 µg C-CO₂.jour⁻¹.g⁻¹ sol sec *versus* 1,5 µg C-CO₂.jour⁻¹.g⁻¹ sol sec. Dans un tel contexte, l'effet vers s'en trouve d'autant masqué, mais est effectif.

III.3.4 Dynamique temporelle de l'activité respiratoire

La minéralisation du carbone est spatialement hétérogène et variable au cours du temps. Elle est d'intensité différente selon les microsites de sol et elle évolue aussi différemment avec l'âge de ces structures (figure III.1).

Le surplus de respiration est maximal dans les turricules frais. Cependant un second surplus de respiration est observé dans les turricules et galeries âgés (40 et 50 jours). Cette augmentation pourrait correspondre à la mobilisation et à la minéralisation d'un 2^e pool de carbone après épuisement d'un premier pool plus disponible. Ce 2^e pool de carbone serait épuisé après 62 jours.

En microcosmes, malgré la température constante (12°C) et l'humidité maintenue, la respiration des sols s'affaiblit avec l'allongement de la durée d'incubation. Cet affaiblissement, à partir de 40, 45 jours traduit vraisemblablement la stabilité du dispositif expérimental, activité sur-stimulée lors de la mise en place des microcosmes.

III.3.5 Réponse des lombriciens à l'écotoxicité de l'atrazine

D'une manière générale, les lombriciens présentent des réponses variables aux pesticides suivant la molécule, la dose et le mode d'application. Les effets toxiques de deux molécules molluscicides apportés sous forme de granulés, ont été étudiés sur *L. terrestris* et *Allolobophora chlorotica chlorotica*. Seul l'une d'entre elle provoque la mortalité des vers de terre (Fayolle et Stawiecki, 1990). Les activités d'*Aporrectodea caliginosa* sont inhibées par une exposition à une dose sublétales d'aldicarb, un insecticide nématocide (mélangé au sol de la colonne) (Texier *et al.*, 1995). Après 4 ans, la réduction des utilisations de pesticides au champ (au moins de 50 % et pas d'application de nématicides, ni d'insecticides) n'a pas entraîné de différences écologiques significatives entre les populations de lombriciens (Tarrant *et al.*, 1997). L'atrazine est un herbicide toxique pour les grenouilles *Xenopus laevis* (Hayes *et al.*, 2002), les souris (Liskova *et al.*, 2000) et diminue la production de cytokines humaines (Hooghe *et al.*, 2000). Fischer (1989) a observé des mortalités, des retards de croissance, une diminution du potentiel de reproduction et une altération de l'épithélium intestinal chez *Eisenia foetida* après exposition à l'atrazine. Toutefois dans cette étude les doses par kilogramme de substrat étaient 260 à 1300 fois supérieures à celles de nos expérimentations. Nos observations n'ont pas montré de toxicité aiguë de l'atrazine à court terme, toutefois aucune mesure écotoxicologique spécifique n'a été entreprise. Par contre à long terme, la respiration des lombriciens est ralentie en présence d'atrazine et les individus peuvent subir une perte pondérale mais qui n'est pas systématique (*A. caliginosa* est ici plus touché que *L. terrestris*).

Une contamination radioactive à la surface des cocons a également été mise en évidence. Son origine peut être liée à une contamination de leur environnement immédiat ou à une contamination par l'intermédiaire du ver lors de la formation du cocon. La contamination à la surface des cocons ne semble pas interférer leur développement ni sur la survie des juvéniles obtenus. La contamination radioactive plus importante à la surface des vers s'explique par le

déplacement du ver, surtout dans les couches superficielles du sol où il se nourrit, et où l'atrazine est abondante. La probabilité de rentrer en contact avec les molécules herbicides est donc bien supérieure pour les vers.

Aucun effet significatif n'est observé sur le comportement des lombriciens, ni sur la reproduction. Les différences observées entre les microcosmes avec et sans atrazine à propos des indices d'activité ne permettent pas de conclure à un effet direct significativement néfaste de l'atrazine sur les individus de nos expérimentations. La diminution de la respiration des vers en présence d'atrazine est l'effet le plus net observé.

En conclusion, dans les conditions expérimentales définies aucune modification significative du comportement, ni des activités biologiques, ni de l'état physiologique des lombriciens n'a été constatée après une exposition prolongée à l'atrazine. Les lombriciens sont des ingénieurs des sols (Stork et Eggleton, 1992 ; Lavelle, 1997), et sont donc susceptibles d'être des acteurs potentiels de la régulation du devenir des molécules herbicides dans le sol.

**CHAPITRE IV MINÉRALISATION DE L'ATRAZINE ET
IMPORTANCE DES INTERACTIONS LOMBRICIENS –
MICROORGANISMES**

Les lombriciens sont connus pour stimuler l'activité microbienne du sol. D'autre part, les micro-organismes sont responsables de la minéralisation de l'atrazine. L'hypothèse, ici testée, est la contribution de la macrofaune lombricienne à la dégradation partielle ou totale de l'atrazine par stimulation de l'activité de la microflore dégradante.

IV.1 Minéralisation de l'atrazine

L'influence des lombriciens sur la minéralisation de l'atrazine a été étudiée à différentes échelles d'investigation.

IV.1.1 Le constat : minéralisation ralentie en présence de vers

IV.1.1.a A l'échelle des colonnes de sol : les microcosmes

✓ Dynamiques de minéralisation

Les dynamiques de minéralisation sont exprimées en pourcentage de carbone marqué au ^{14}C , retrouvé sous forme de CO_2 et issu de l'atrazine initiale appliquée, au cours des 86 et des 62 jours d'incubation de l'Exp. 1 et 2 (figure IV.1 et 2).

A partir de sol réhumecté, l'Exp. 1 en microcosmes, au laboratoire, nous a permis de suivre la minéralisation de l'atrazine, en présence et en absence de vers. La dynamique de minéralisation de l'atrazine est globalement supérieure en absence de vers. Elle présente deux phases : un début de minéralisation de l'atrazine rapide sans temps de latence qui augmente jusqu'au pic de minéralisation 7 et 9 jours après l'application d'atrazine (respectivement avec et sans vers 0,51 et 0,74 % de l'atrazine initialement appliquée [U-ring- ^{14}C] par jour) avant de ralentir. La vitesse de minéralisation de l'atrazine se stabilise à moins de 0,25 % de la quantité initiale, 19 jours après son application. L'écart entre les deux modalités décroît progressivement de 45 % à 43 jours (Test de Kruskal-Wallis, 95%, 43 j-, $n = 6$, $p = 0,004$) à 34 % à 86 jours (Test de Kruskal-Wallis, 95%, 86 j-, $n = 3$, $p = 0,050$), mais reste significativement supérieure en absence de vers.

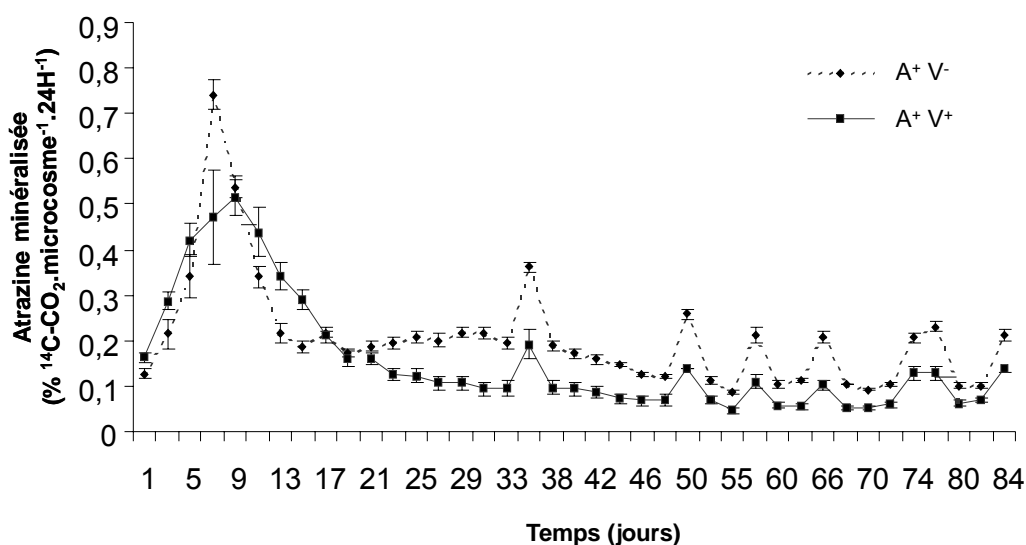


Figure IV.1 Dynamique de la minéralisation de l'atrazine ([U-ring- ^{14}C]) avec vers et sans vers, pendant 86 jours d'incubation (Exp. 1). Les barres indiquent les erreurs standards.

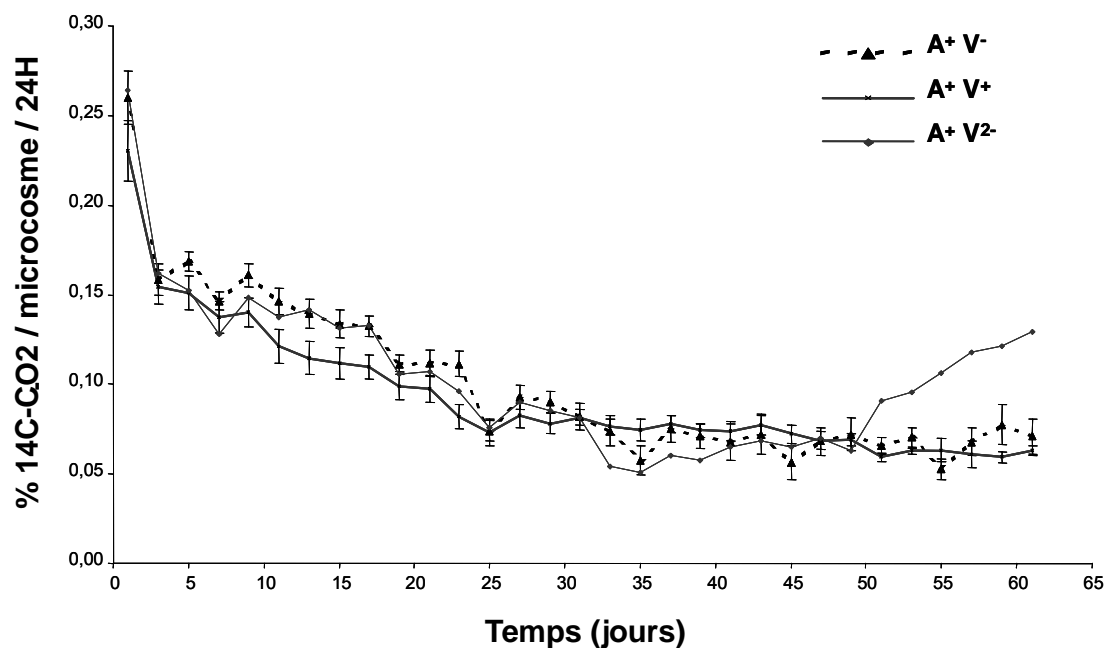


Figure IV.2 Dynamique de la minéralisation de l'atrazine ([U-ring- ^{14}C]) avec vers ($\text{A}^+ \text{V}^+$), sans vers avec enfouissement de la litière dans une fausse galerie ($\text{A}^+ \text{V}^-$) et sans vers avec enfouissement de la litière sur la surface de la colonne ($\text{A}^+ \text{V}^{2-}$), pendant 62 jours d'incubation (Exp. 2). Les barres indiquent les erreurs standards.

A partir de sol frais, l'Exp. 2, en microcosmes au laboratoire, nous a permis de suivre la minéralisation de l'atrazine, en présence et en absence de vers sur 62 jours. La dynamique de

minéralisation présente également deux phases : un ralentissement rapide de la minéralisation de l'atrazine jusqu'au 19^e jour, suivi d'un ralentissement plus progressif. Aucun pic de minéralisation n'est observé et la vitesse de minéralisation diminue depuis le jour suivant l'application d'atrazine avec 0,26 et 0,23 % d'atrazine minéralisée en absence et en présence de vers (Test de Kruskal-Wallis, 95%, au jour 1, $n = 18$, $p = 0,327$). Après 19 jours d'incubation, la vitesse de minéralisation reste inférieure à 0,11 et 0,10 % respectivement sans et avec vers. Durant cette phase l'écart entre les deux modalités est inférieur ou égal à 0,02 % d'atrazine minéralisée par microcosme et par jour mais est parfois significatif (Test de Kruskal-Wallis, 95%, au jour 17, $n = 15$, $p = 0,021$; au jour 23, $n = 12$, $p = 0,015$).

✓ Atrazine totale minéralisée

Les quantités cumulées d'atrazine minéralisée exprimées en pourcentage de carbone marqué au ^{14}C de l'atrazine initiale appliquée, au cours des 86 et des 62 jours, sont représentées en figure IV.3 et 4.

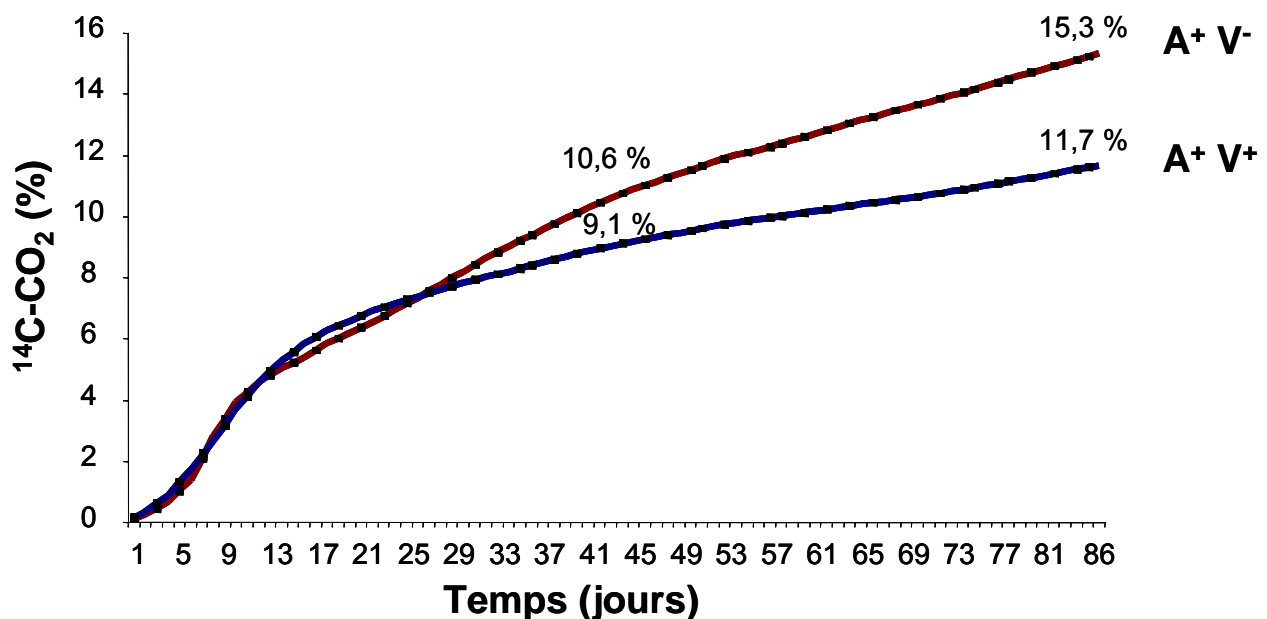


Figure IV.3 Minéralisation de l'[U-ring- ^{14}C]atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) avec vers ($A^+ V^+$) et sans vers ($A^+ V^-$), pendant 86 jours d'incubation (Exp. 1). Les barres indiquent les erreurs standards.

A partir de sol réhumecté, en microcosmes, au laboratoire (Exp. 1), les quantités cumulées d'atrazine minéralisée sont équivalentes sur les 30 premiers jours au sein des deux traitements avec et sans vers (figure IV.3). Après 25 jours d'incubation, les quantités diffèrent et l'écart entre les deux modalités s'accroît : après 86 jours un quart (24 %) en moins d'atrazine est minéralisé en présence de vers. Après 86 jours d'incubation, 15,2 % de l'apport initial d'atrazine est métabolisé en absence de vers et 11,7 % en présence de vers mais les quantités ne sont pas significativement différentes (Test de Kruskal-Wallis, 95%, 86 j-, n = 3, p = 0,127).

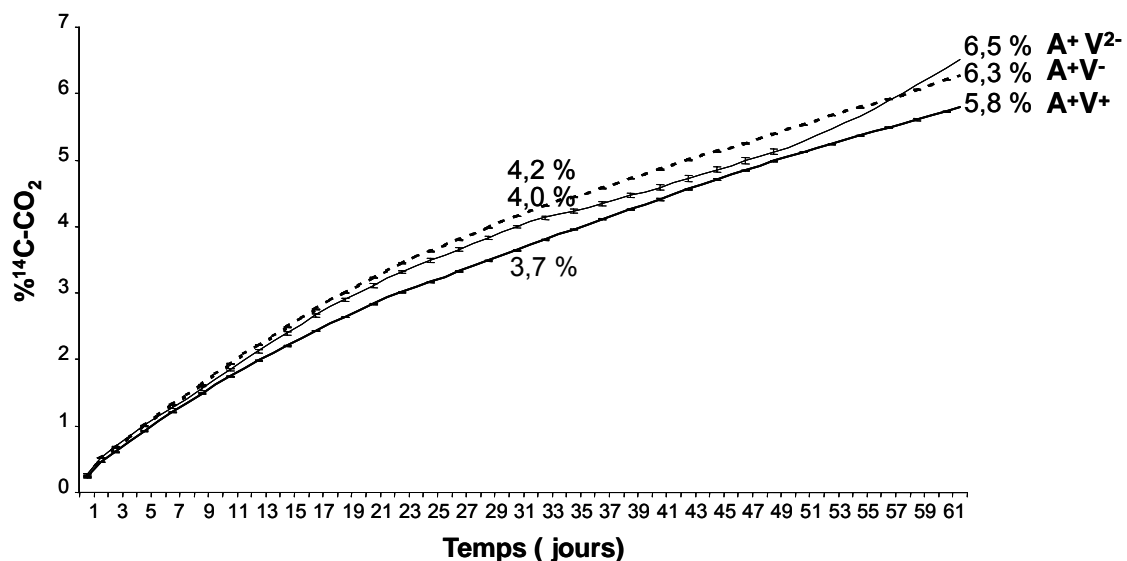


Figure IV.4 Minéralisation de l'[U-ring-¹⁴C]atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) avec vers (A⁺ V⁺) et sans vers avec enfouissement de la litière dans une fausse galerie (A⁺ V⁻) et sans vers avec enfouissement de la litière sur la surface de la colonne (A⁺ V²⁻), pendant 62 jours d'incubation (Exp. 2). Les barres indiquent les erreurs standards.

A partir de sol frais en microcosmes, au laboratoire (Exp. 2), les quantités cumulées d'atrazine minéralisée évoluent de manière similaire entre les différentes modalités (figure IV.4). Elles sont légèrement supérieures en absence de vers au cours de l'incubation. Après 62 jours d'incubation, 6,3 % de l'apport initial d'atrazine est métabolisé en absence de vers et 5,8 % en présence de vers (A⁺ V⁺ vs A⁺ V⁻ : - 8%) mais ne sont pas significativement différentes (Test de Kruskal-Wallis, 95%, 62 j-, n = 3, p = 0,275).

L'atrazine totale minéralisée en absence de vers et avec enfouissement de la litière sur toute la surface de la colonne est intermédiaire aux deux autres modalités jusqu'à 49 jours d'incubation. Le nombre de répétitions de cette modalité est moindre par rapport aux deux autres. Après déstructuration progressive, seul un microcosme représente A⁺ V²⁻, après 51 jours, ce qui

explique l'augmentation de minéralisation en fin d'incubation avec 6,5 % de l'apport initial en fin d'incubation ($A^+ V^-$ vs $A^+ V^{2-}$: - 3,6 %).

IV.1.1.b A l'échelle des mésocosmes, au terrain

La dynamique de la minéralisation de l'atrazine, au terrain en mésocosmes (figure IV.5) présente également deux phases : une minéralisation rapide sur les 45 premiers jours avec des maximums à 24 jours (0,81 et 0,70 % d'atrazine minéralisée respectivement en absence et en présence de vers). Après le pic de minéralisation la vitesse ralentit et reste inférieure à 0,10 % après 80 jours. La dynamique de minéralisation de l'atrazine est globalement inférieure en présence de vers même si l'écart entre les deux modalités est faible et non significativement différent (Test de Kruskal-Wallis, 95%, à 24 jours, $n = 6$, $p = 0,423$).

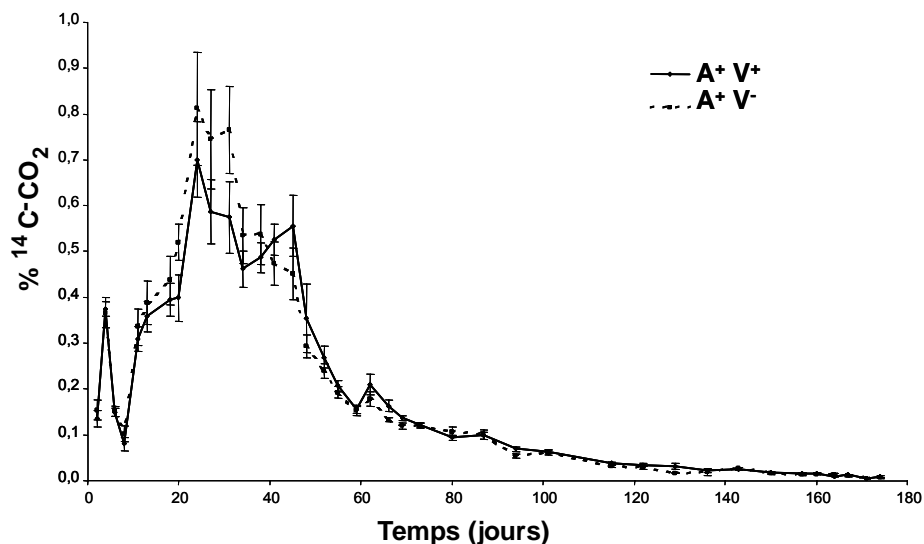


Figure IV.5 Suivi de la minéralisation de l'[U-ring- ^{14}C]atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) avec vers ($A^+ V^+$) et sans vers ($A^+ V^-$), pendant 174 jours. Les barres indiquent les erreurs standards.

Les quantités cumulées d'atrazine minéralisée, en pourcentage de l'apport initial évoluent de manière similaire et asymptotique (figure IV.6). Le point d'inflexion se situe après le 24^e jour.

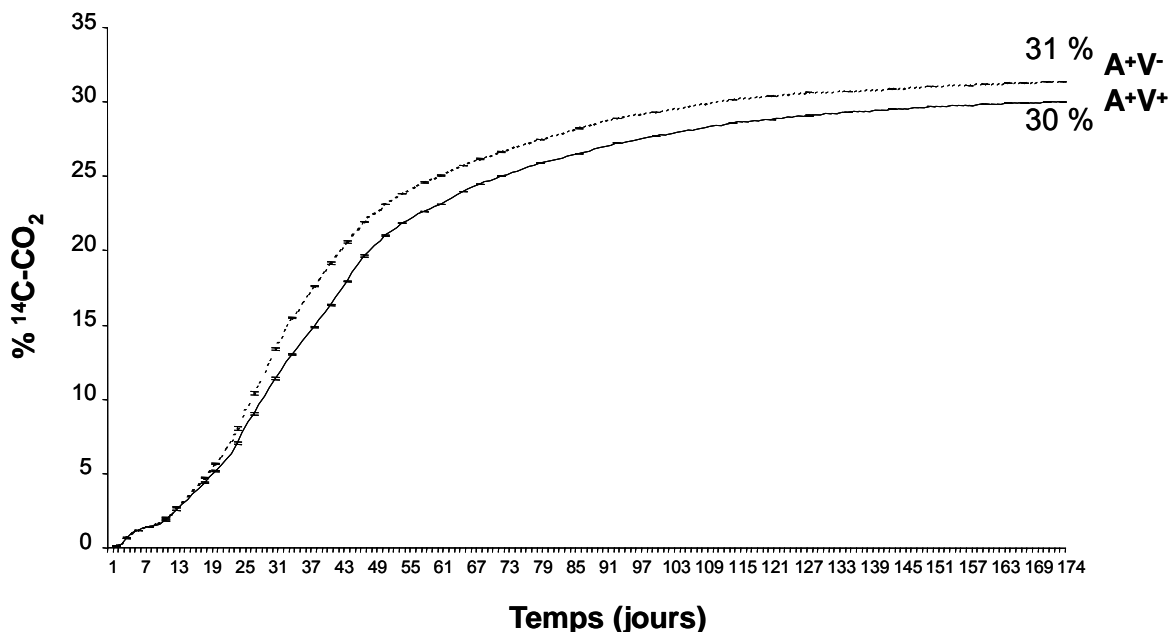


Figure IV.6 Minéralisation de l'[U-ring-14C]atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) avec vers (A⁺ V⁺) et sans vers (A⁺ V⁻), pendant 174 jours. Les barres indiquent les erreurs standards.

Après 174 jours, les quantités totales d'atrazine minéralisée sont supérieures en absence de vers (+ 4 %), mais pas significativement différentes (Test de Kruskal-Wallis, 95%, à 174 jours, n = 6, p = 0,423). Après 6 mois, 31,3 % de l'apport initial d'atrazine est métabolisé en absence de vers et 30,0 % en présence de vers.

IV.1.1.c A l'échelle des microsites de sol : minéralisation potentielle de l'atrazine

Différents microsites de sol représentatifs de l'activité des vers et du sol non remanié par les vers ont été échantillonnés dans les microcosmes, après différents temps d'incubation (11, 21, 32, 40, 50 et 62 jours). Après un second apport d'atrazine ces microsites de sol sont incubés pendant 26 à 29 jours. Les quantités cumulées d'atrazine minéralisées sont représentées en figure IV.7, suivant l'âge des microsites.

Les turricules minéralisent des quantités d'atrazine supérieures aux autres microsites à 11 jours d'âge. Les quantités minéralisées au cours de l'incubation, diminuent progressivement et sont après 40 jours d'âge équivalentes au sol non remanié des premiers horizons. Après 62 jours les turricules minéralisent de faibles quantités d'atrazine équivalentes à celles minéralisées par le sol des horizons inférieurs (35,2 % de la quantité initiale). Les 200 % d'atrazine minéralisée à

11 jours, dans les turricules correspondent à la minéralisation de la totalité (100 %) de l'atrazine apportée sur le microsite (2^e apport) et à la minéralisation d'une partie de l'atrazine apportée sur les colonnes (1^{er} apport) et retenue dans les turricules. Deux cas extrêmes se présentent : 100 % du 2^e apport minéralisé + 100 % du 1^{er} apport soit 2,3 % de l'atrazine du 1^{er} apport minéralisée (une fois recalculé en fonction de la quantité appliquée lors du 1^{er} apport) ou bien 0 % + 200 %, soit 4,7 % (après recalcul) de l'atrazine du 1^{er} apport minéralisée.

Pour les galeries de 11 jours, les quantités minéralisées sont équivalentes à celle du sol non remanié des premiers horizons (V.G : 65,8 % vs S.2 : 59,3 %). Avec l'âge les quantités minéralisées diminuent et sont intermédiaires à celles minéralisées dans le sol non remanié des premiers horizons et des horizons inférieurs (à 62j-, V.G : 56,4 % vs S.2 : 67,6 % et S.10 : 37,2 %).

Le sol non remanié par les vers minéralise des quantités différentes en fonction de sa profondeur et de la présence de vers dans le microcosme. Les quantités totales sont supérieures dans le sol non remanié des horizons de surface (0-2 cm et 2-5 cm : > 40 % d'atrazine minéralisée *versus* 5-10 cm et 10-15 cm : < 45 % de l'atrazine appliquée). Pour les horizons 0-2 cm et 2-5 cm, les quantités minéralisées dans le sol en absence de vers (S.2 et S.5) sont respectivement supérieures à celles minéralisées en présence de vers (V.2 et V.5). Les quantités minéralisées sont plus élevées pour V.10 et V.15 que pour S.10 et S.15.

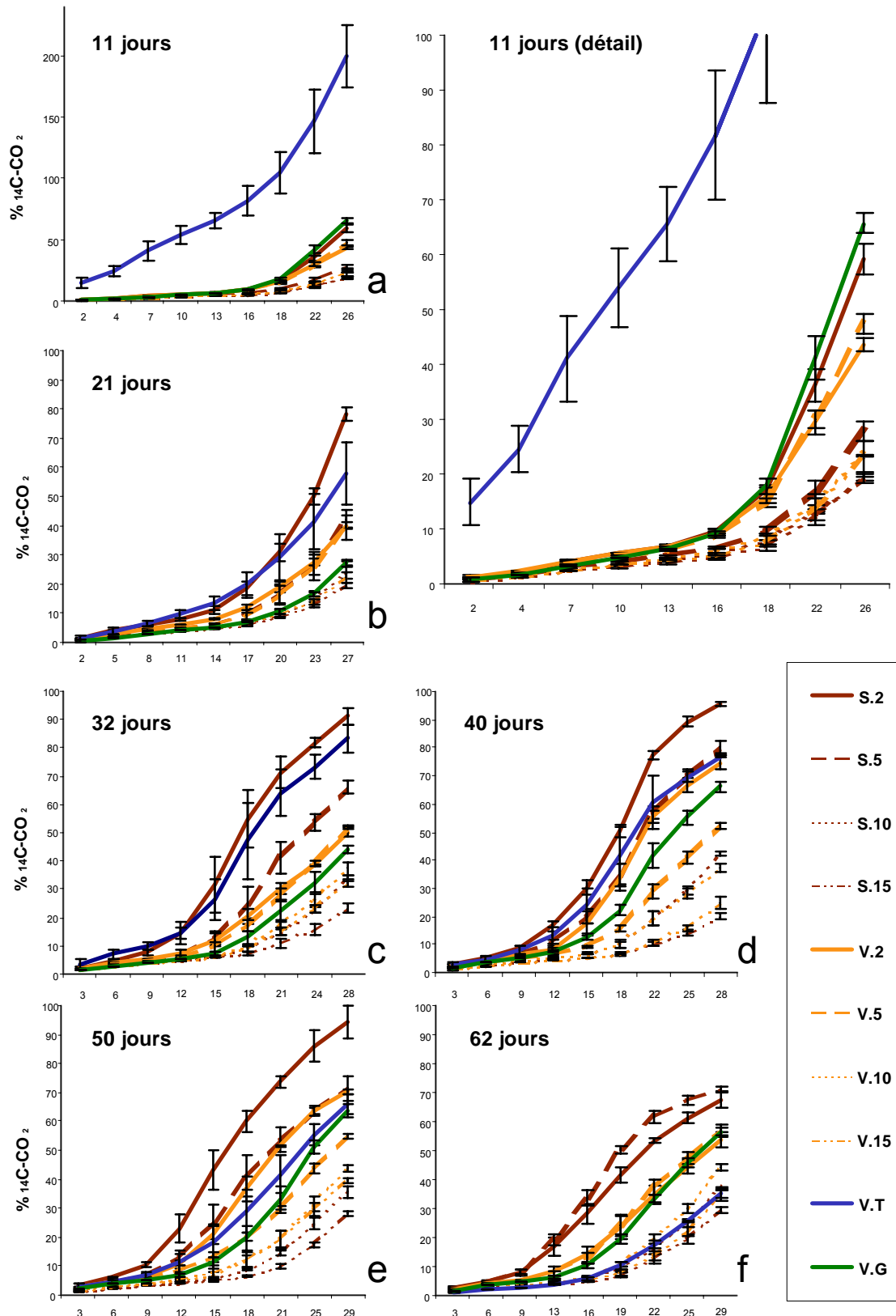


Figure IV.7 Minéralisation de l'atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) dans les microsites de sol échantillonnés à 11, 21, 32, 40, 50, 62 jours à partir des microcosmes sans vers (S.2, S.5, S.10, S.15) et des microcosmes avec vers (V.2, V.5, V.10, V.15, V.T, V.G), (Exp. 2). Les barres indiquent les erreurs standards.

Pour les turricules, les galeries et le sol non remanié S.2, les taux de minéralisation sont les plus élevés respectivement à 11j-, à 11 et 40j-, et entre 30 et 50 jours d'âge. Pour le sol en profondeur, avec ou sans vers les taux sont inférieurs et relativement stables ($<1,5\%$ $^{14}\text{C-CO}_2$.jour⁻¹.g⁻¹, pour 5-10 et 10-15 cm) (figure IV.8).

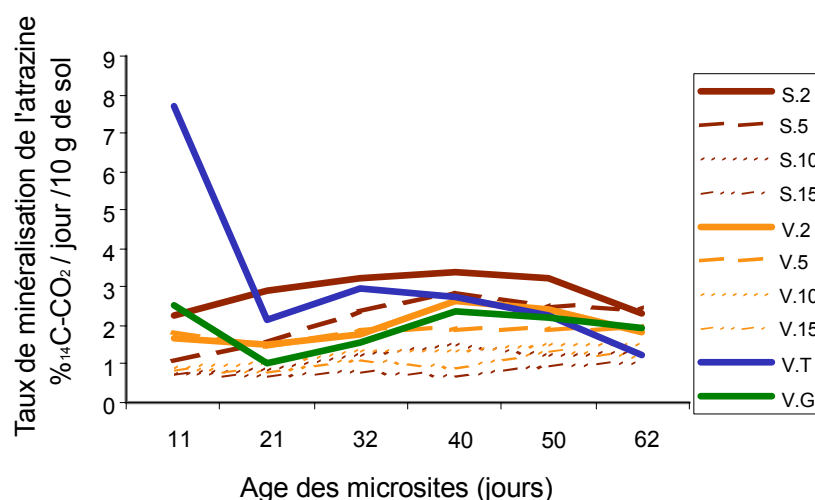


Figure IV.8 Taux de minéralisation de l'[U-ring- ^{14}C]atrazine (en % de l'atrazine initialement apportée) dans les microsites de sol remaniés ou non par les vers et prélevés à différentes profondeurs en fonction de leur d'âge.

RESUME : la minéralisation de l'atrazine se fait en deux temps, après un pic consécutif à l'application de l'herbicide, le taux de minéralisation journalier se stabilise. Au terme de l'incubation ou de la période de suivi la quantité d'atrazine minéralisée est ralentie en présence de vers (en microcosmes : 15,2 % *versus* 11,7 % avec du sol ré-humidifié, 6,3 % *vs* 5,8 % avec du sol frais ; au terrain : 31,3 % *s* 30,0 %). Dans les microsites de sol isolés à partir des microcosmes, la minéralisation potentielle de l'atrazine est toutefois supérieure dans les turricules à 11 jours d'âge. Les quantités minéralisées y sont par la suite inférieures à celles dans le sol de surface. Les parois de galeries prélevées sur toute la hauteur de la colonne minéralisent des quantités d'atrazine inférieures au sol de surface sans vers et équivalentes à celles du sol de surface avec vers.

Tableau IV.1 : Atrazine minéralisée et taux de minéralisation, durée et température d'incubation, conditionnement du sol, et échelle d'investigation, au cours des expérimentations

Echelle	Durée (jours)	Total minéralisé (% $^{14}\text{C-CO}_2$) et <i>taux de minéralisation</i> (% $^{14}\text{C-CO}_2/24^{\text{h}}$ / g sol sec)		Ecart V^- / V^+ (pourcentage)	Sol (éq. sec) Température
		Sans Vers	Avec Vers		
Microsites	26 j- âge : 11 j-	S.O : 59,34 0,23	V.T : 199,83 0,77 V.G : 65,76 0,25	+ 237 % + 11 %	10 g de sol Sol frais 20°C
	27 j- âge : 21 j-	S.O : 78,37 0,29	V.T : 57,92 0,21 V.G : 27,21 0,10	- 26 % - 65 %	
	28 j- âge : 32 j-	S.O : 91,14 0,33	V.T : 83,29 0,30 V.G : 44,10 0,16	- 8 % - 52 %	
	28 j- âge : 40 j-	S.O : 95,79 0,34	V.T : 76,78 0,27 V.G : 66,07 0,24	- 20 % - 31 %	
	29 j- âge : 50 j-	S.O : 94,29 0,33	V.T : 65,97 0,24 V.G : 63,63 0,22	- 30 % - 33 %	
	29 j- âge : 62 j-	S.O : 67,58 0,23	V.T : 35,17 0,12 V.G : 56,35 0,19	- 48 % - 17 %	
Microcosmes	86 j-	15,33 $117,3.10^{-6}$	11,68 $89,3.10^{-6}$	- 24 %	1520 g de sol Sol réhumecté 12°C
Microcosmes	62 j-	6,28 $66,6.10^{-6}$	5,80 $61,5.10^{-6}$	- 8 %	1520 g de sol Sol frais 12°C
Mésocosmes	174 j-	31,34 $3,6.10^{-6}$	29,99 $3,4.10^{-6}$	- 4 %	50400 g de sol Sol frais Temp. extérieure

IV.2 Mécanismes impliqués dans le ralentissement de la minéralisation

Il s'agit ici de déterminer si le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine est lié aux interactions lombriciens-communautés microbiennes dégradant l'atrazine.

IV.2.1 Effets du pré-traitement atrazine et des vers de terre sur la structuration des communautés microbiennes du sol

Au cours de cette partie les communautés microbiennes des microsites de sol prélevés dans les microcosmes en présence et en absence de vers sont analysées.

IV.2.1.a Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des acides nucléiques *i.e.* ADN et ARN totaux varie de 0,03 à 0,21 mg.g⁻¹ de sol sec (tableau IV.2) et les différences ne sont pas constantes d'un traitement à l'autre. Les rendements d'extraction sont en général supérieurs dans les endentères et participent probablement à l'effet microsite observé en Modèle Linéaire Généralisé (tableau IV.3).

Tableau IV.2 Rendement d'extraction (en mg.g⁻¹ de sol sec) des acides nucléiques (ADN et ARN) dans les microsites sol non remanié en absence (S Se) et en présence (SV Se) de vers, dans les turricules (SV Tu), les galeries (SV Ga) et les endentères (SV En), issus des différentes modalités expérimentales avec ou sans atrazine et / ou avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP.

	S	SA	SP	SPA
S Se	0,12 (±0,02)	0,08 (±0,01)	0,04 (±0,01)	0,09 (±0,02)
SV Se	0,05 (±0,01)	0,03 (±0,00)	0,16 (±0,01)	0,09 (±0,02)
SV Ga	0,05 (±0,00)	0,19 (±0,02)	0,08 (±0,01)	0,09 (±0,01)
SV Tu	0,20 (±0,04)	0,09 (±0,02)	0,08 (±0,01)	0,08 (±0,01)
SV En	0,16 (±0,00)	0,21 (±0,08)	0,14 (±0,02)	0,17 (±0,01)

Tableau IV.3 Modèles linéaires généralisés des rendements d'extraction des acides nucléiques en fonction des facteurs pré-traitement à l'atrazine (A)atrazine, inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (P), microsites de sol (M) et de leurs interactions.

	Rendement d'extraction	
	F	P
Atrazine	0,41	0,526
<i>Pseudomonas</i> sp, Adp	2,15	0,151
Microsites	8,21	0,000
A*P	0,00	0,970
A*M	7,14	0,000
P*M	7,33	0,000
A*P*M	5,29	0,002

IV.2.1.b Communautés microbiennes au sein des microsites de sol

La structure des communautés microbiennes des différents microsites de sol a été évaluée en appliquant l'Analyse des espaces inter-géniques des ribosomes (RISA) sur l'ADN extrait directement des échantillons de sol. La RISA a révélé le polymorphisme de longueur de l'espace inter-génique 16S-23S de l'opéron bactérien (Borneman, 1997 #322). La RISA effectuée sur l'ADN extrait directement du sol non remanié sans vers (S-Se), avec vers (Sv-Se), le sol des parois de galeries (Sv-Ga), des turricules (Sv-Tu) et des endentères (Sv-En) échantillonnés des microcosmes des modalités avec ou sans atrazine et avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (S, SA, SP et SPA) a permis de mettre de évidence des profils complexes (30 ou 40 bandes par échantillon) (figure IV.9 et 10). Dans la plupart des cas , ils étaient similaires entre les répétitions. Leur comparaison permet de différencier trois types de sols. L'analyse en composante principale basée sur l'intensité et le nombre de bandes observées nous a permis de différencier les communautés bactériennes associées aux différents traitements (figure IV.11a, b, c, d).

Pour le sol S le premier et le second axes résument respectivement 53,5 % et 15,1 % de l'inertie (figure IV.11a). Le premier axe permet de différencier les communautés bactériennes suivant leur microsite d'origine. Les communautés de S-Se, Sv-Se et Sv-Tu sont assez similaires et fortement différentes de celles de Sv-Ga et Sv-En. Les vers ont donc modifié la structure globale de la microflore du sol.

Pour le sol SA, le premier et le second axes résument respectivement 40,99 % et 20,11 % de l'inertie (figure IV.11b). Seules les communautés bactériennes du sol des endentères (Sv-En) se différencient de celles des autres microsites qui sont, dans ce cas très similaires. L'application d'atrazine a modifié l'impact des vers sur la structuration des communautés microbiennes.

Pour SP, le premier et le second axes résument respectivement 42,58 % et 23,28 % de l'inertie (figure IV.11c). Suivant l'axe 2, le sol bioturbé par les vers se différencie du sol non remanié (Sv-En, Sv-Tu, Sv-Ga vs Sv-Se, S-Se). En fonction de l'axe 1 les communautés bactériennes de Sv-

EN se différencie de celles de (Sv-Tu, Sv-Ga). Les vers ont donc modifié la structure de la microflore du sol. La présence de *Pseudomonas* sp. ADP a modifié la structure globale des communautés (SP vs S).

Pour SPA, le premier et le second axes résument respectivement 72,50 % et 12,47 % de l'inertie (figure IV.11d). Suivant l'axe 1, les communautés bactériennes de l'endotère se différencient de celles des autres microsites de sol. Suivant l'axe 2 les communautés bactériennes de S-Se se différencient de celles de Sv-Se, Sv-Tu et Sv-Ga. L'interaction entre atrazine et *Pseudomonas* sp. ADP a modifié significativement la structure globale des communautés.

Pour les champignons les analyses statistiques sont en cours mais il semble que les communautés fongiques soient également structurées par les lombriciens.

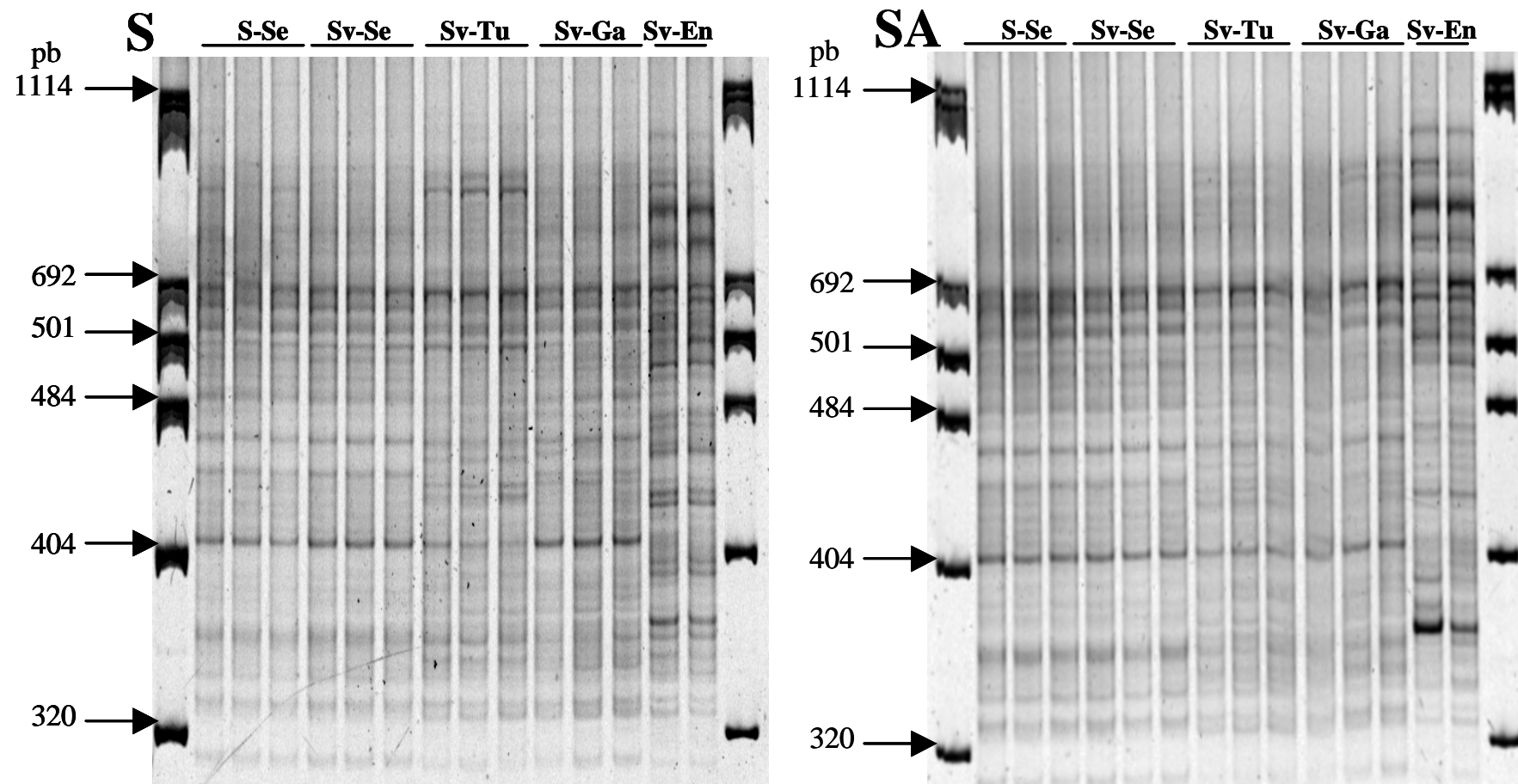


Figure IV.9 Gels acrylamides (6 %) des Risa 16s 23s (PCR IGS), traduisant la diversité bactérienne dans les microsites de sol (S-Se, SvSe, SvTu, Sv-Ga et Sv-En), des modalités S et SA.

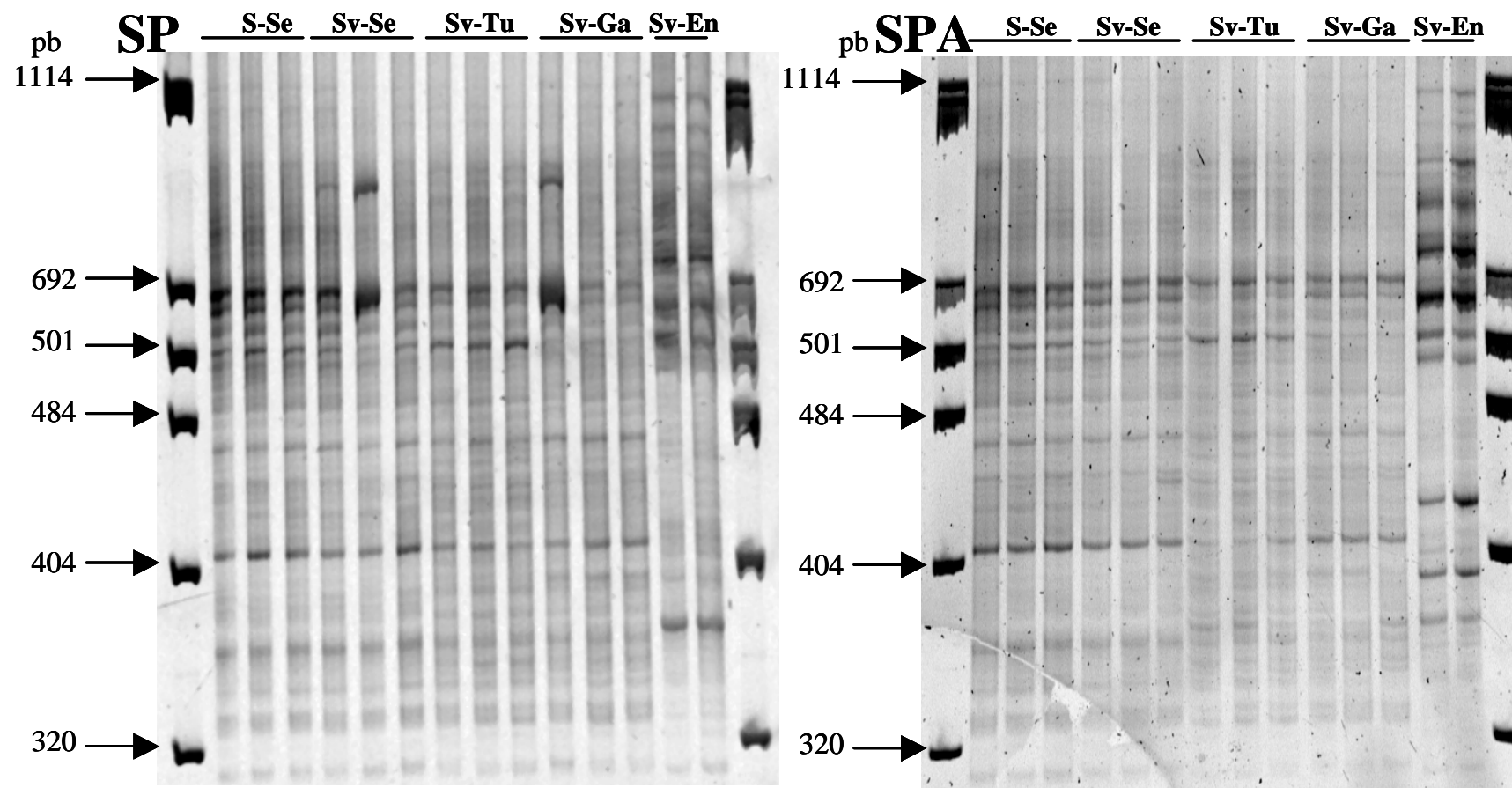


Figure IV.10 Gels acrylamides (6 %) des Risa 16s 23s (PCR IGS), traduisant la diversité bactérienne dans les microsites de sol (S-Se, SvSe, SvTu, Sv-Ga et Sv-En), des modalités SP et SPA.

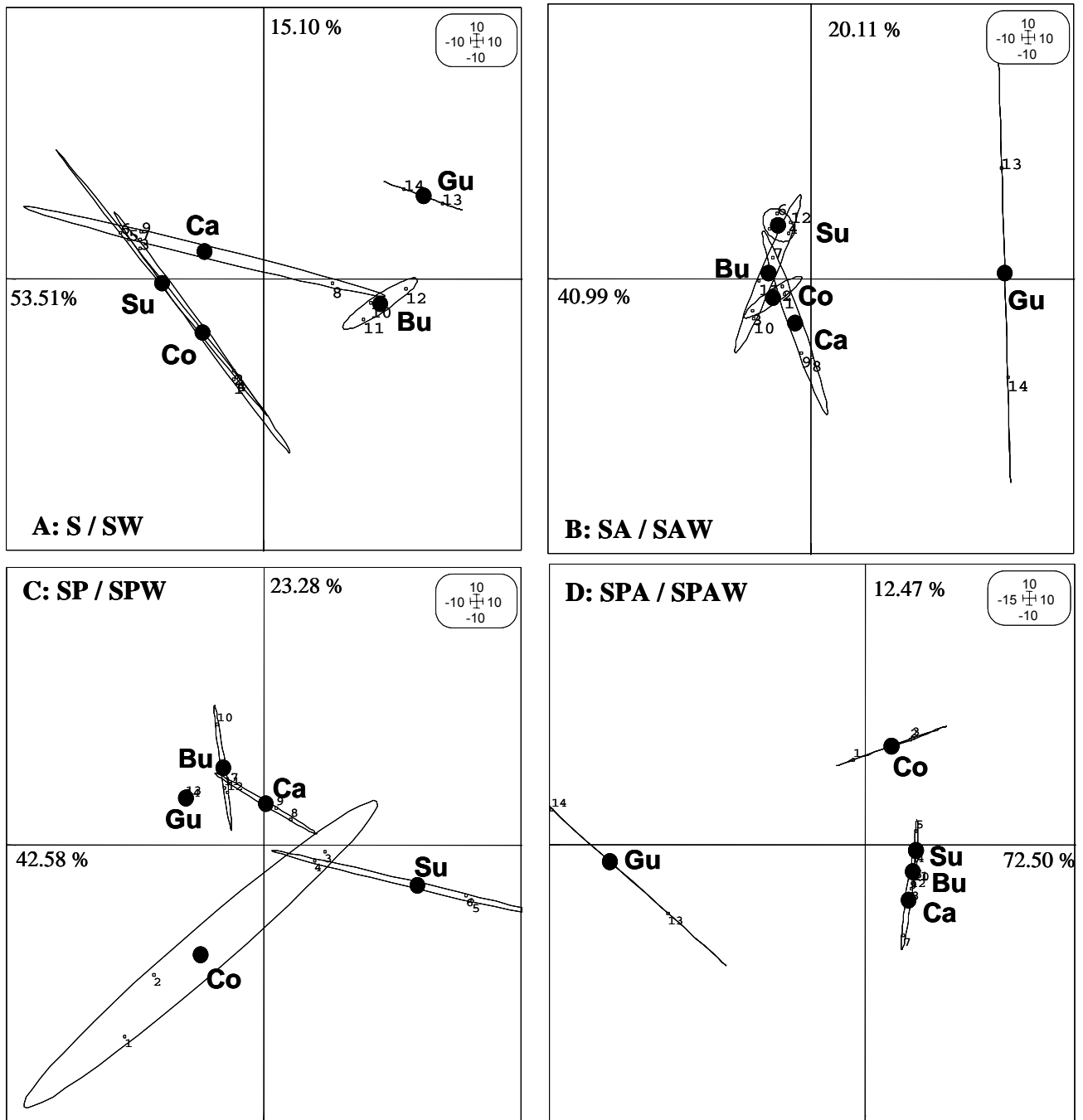


Figure IV.11 : Analyse en Composantes Principales (ACP) des Risa 16s et 23s sur les microsites de sol (S-Se, SvSe, SvTu, Sv-Ga et Sv-En), des modalités S, SA, SP et SPA.

IV.2.2 Effet du pré-traitement atrazine et des vers de terre sur l'activité des communautés microbiennes

IV.2.2.a Niveau d'activité de la microflore au sein des microsites de sol

Le ratio ADN / ARN témoigne du niveau d'activité de la microflore tellurique dans les différents microsites de sol en fonction des quatre modalités étudiées (figure IV.12). Le niveau d'activité, inversement proportionnel au ratio ADN / ARN est globalement supérieur au sein des microsites turricules et endentères (effet microsite, MLG A, tableau IV.4). Il est similaire dans les microsites de sol non remanié en présence et en absence de vers quelle que soit la modalité (SV-Se et S-Se). Le niveau d'activité dans les galeries prélevées à partir du sol non inoculé (S et SA) ont un niveau d'activité intermédiaire à celui des turricules - endentères et du sol non remanié. L'analyse en Modèle Linéaire Généralisé confirme l'effet des microsites sur le niveau d'activité de la microflore. L'atrazine comme l'inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP n'a pas d'effet sur le niveau l'activité de la microflore (MLG A, tableau IV.4). En revanche les galeries et le sol non remanié (S-Se et SV-Se), ont un niveau d'activité respectivement inférieure et supérieur dans SP et SPA (effet P*M, MLG A, tableau IV.4). L'analyse en Modèle Linéaire Généralisé confirme l'effet de l'interaction entre les microsites et *Pseudomonas* sp. ADP.

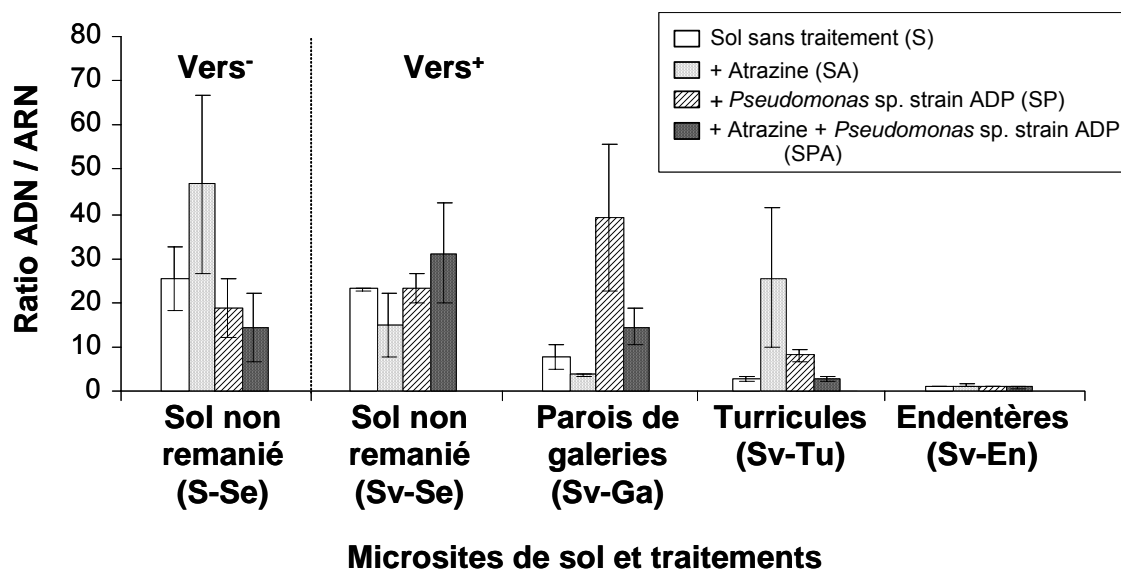


Figure IV.12 Ratio ADN / ARN des extractions d'acides nucléiques à partir des microsites de sol non remanié en présence et en absence de vers, parois de galeries, turricules et endentères à la suite d'incubation de colonnes avec ou sans atrazine et / ou avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP. Les barres indiquent les erreurs standards.

Tableau IV.4 Modèles linéaires généralisés des ratio ADN / ARN des extractions d'acides nucléiques en fonction des facteurs pré-traitement à l'atrazine (A) atrazine, inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (P), microsites de sol (M) et de leurs interactions.

	Rendement d'extraction	
	F	P
Atrazine	0,06	0,807
<i>Pseudomonas</i> sp, Adp	0,01	0,916
Microsites	13,62	0,000
A*P	6,41	0,016
A*M	3,55	0,016
P*M	9,78	0,000
A*P*M	3,31	0,021

IV.2.2.b Cinétique de minéralisation de l'atrazine

Les microsites de sol échantillonnés (0,5 g) à partir des microcosmes des quatre modalités (S, SA, SP et SPA) sont soumis à une seconde application d'atrazine. La minéralisation de l'atrazine est exprimée en pourcentage de l'atrazine initiale minéralisée au cours des 28 jours d'incubation (figure IV.13).

Le modèle de Gompertz est appliqué aux données issues de l'analyse de la minéralisation de l'atrazine au sein de microsites échantillonnés de microcosmes incubées avec ou sans atrazine et / ou avec ou sans *Pseudomonas* sp. ADP. Trois constantes sont extraites des courbes modélisées (tableau IV.2.) : la quantité totale d'atrazine minéralisée après 28 jours d'incubation (en pourcentage de l'atrazine marquée au ¹⁴C apportée), la pente de la courbe de Gompertz qui traduit la vitesse de minéralisation et le point d'inflexion qui traduit le temps à partir duquel la vitesse de minéralisation ralentit.

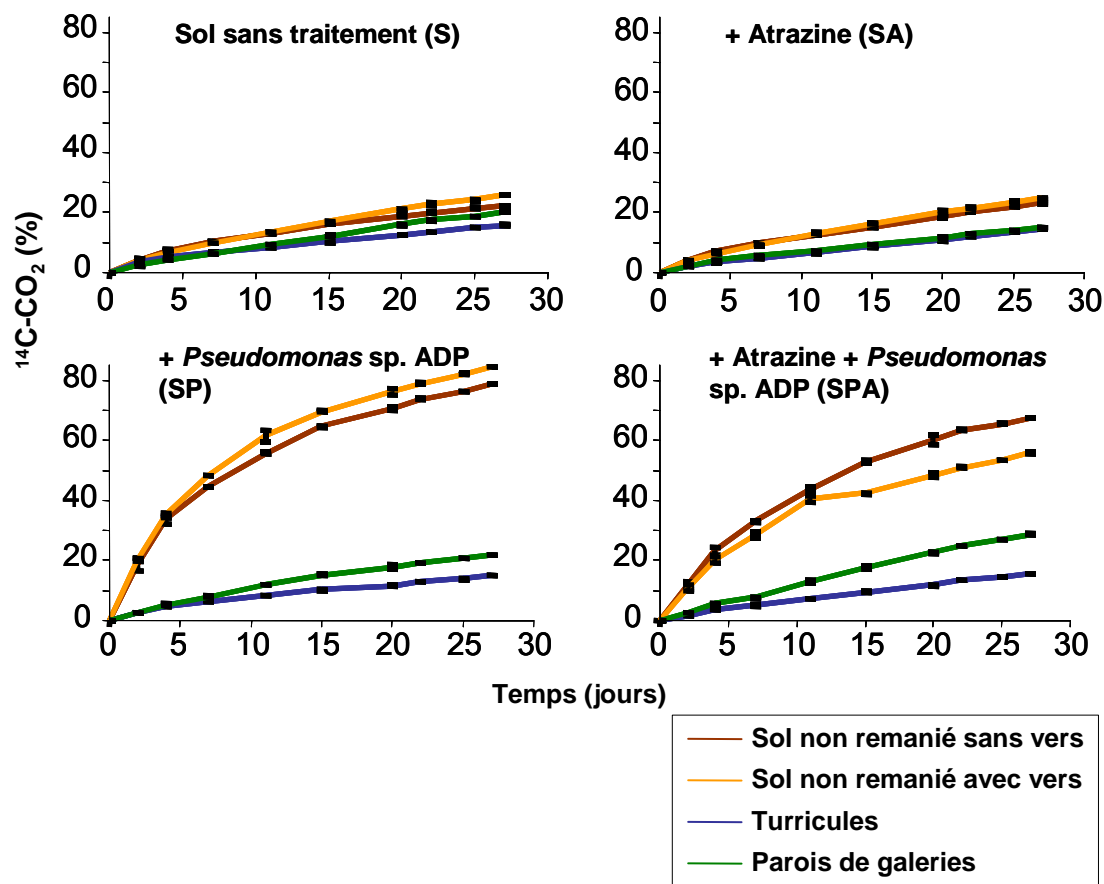


Figure IV.13 Minéralisation de l'atrazine au sein de microsites de sol (sol non remanié en présence et en absence de vers, parois de galeries et turricules) isolés à partir de colonnes incubées avec ou sans atrazine et / ou avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP.

En absence de *Pseudomonas* sp. ADP (S et SA) la minéralisation est similaire dans et entre le traitement S et A. La minéralisation totale de l'atrazine n'y excède pas 20 % par rapport à l'atrazine apportée(constante de Gompertz). La minéralisation de l'atrazine est un peu réduite au sein des microsites parois de galeries et turricules (15 % de l'atrazine appliquée). Le pré-traitement atrazine ne modifie pas la minéralisation (analyse MLG : pas d'effet atrazine tableau IV.5 et SA versus S figure IV.13).

Tableau IV.5 Constantes des modèles de Gompertz appliqués aux courbes de minéralisation de l'atrazine au sein des microsites de sol (sol non remanié en présence et en absence de vers, parois de galeries et turricules) isolés à partir de colonnes incubées avec ou sans atrazine et / ou avec ou sans inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP.

Traitement	Microsites	$^{14}\text{C-CO}_2$ (%)	Pente (min^{-1})	Point d'inflexion (days)
S	-Se	15,49 \pm 2,76	10,30 \pm 0,89	17,75 \pm 0,91
	V-Sv	20,96 \pm 2,79	10,29 \pm 0,88	18,13 \pm 1,04
	V-Ga	13,64 \pm 9,79	10,01 \pm 1,66	17,02 \pm 1,95
	V-Tu	14,58 \pm 6,95	10,43 \pm 0,94	18,30 \pm 0,75
SA	-Se	18,79 \pm 8,37	10,89 \pm 2,82	18,95 \pm 4,97
	V-Sv	18,26 \pm 0,59	11,32 \pm 2,90	19,31 \pm 4,85
	V-Ga	14,82 \pm 2,10	6,34 \pm 5,75	19,73 \pm 1,24
	V-Tu	18,08 \pm 1,02	10,71 \pm 3,91	21,35 \pm 3,00
SP	-Se	77,72 \pm 1,06	5,79 \pm 4,95	19,13 \pm 2,18
	V-Sv	81,29 \pm 8,09	6,69 \pm 5,32	17,16 \pm 2,30
	V-Ga	4,76 \pm 2,52	11,58 \pm 3,16	19,69 \pm 5,87
	V-Tu	13,30 \pm 1,22	11,52 \pm 3,18	19,38 \pm 6,05
SPA	-Se	74,68 \pm 0,84	10,94 \pm 4,02	21,22 \pm 4,51
	V-Sv	74,09 \pm 0,68	8,86 \pm 2,54	18,68 \pm 1,39
	V-Ga	18,52 \pm 7,02	9,62 \pm 3,61	16,88 \pm 2,59
	V-Tu	12,74 \pm 4,03	9,62 \pm 3,61	19,18 \pm 0,67

Tableau IV.6 Modèles linéaires généralisés des constantes des modèles de Gompertz (quantité minéralisée $^{14}\text{C-CO}_2$, pente et point d'inflexion) en fonction des facteurs pré-traitement à l'atrazine (A) atrazine, inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (P), microsites de sol (M) et de leurs interactions.

	$^{14}\text{C-CO}_2$		Pente		Point d'inflexion	
	F	P	F	P	F	P
Atrazine	0,53	0,473	0,01	0,917	0,38	0,543
<i>Pseudomonas</i> sp, Adp	369,99	0,000	0,15	0,704	0,73	0,401
Microsites	183,09	0,000	5,24	0,005	2,51	0,077
A*P	0,04	0,852	1,70	0,203	1,65	0,208
A*M	3,05	0,043	1,65	0,198	0,92	0,441
P*M	151,34	0,000	1,73	0,182	1,40	0,261
A*P*M	2,37	0,090	1,40	0,263	0,85	0,477

En présence de *Pseudomonas* sp. ADP, les quantités totales d'atrazine minéralisée sont 5 fois supérieures dans le sol non remanié en présence et en absence de vers (SP-Se, SP-Sv, SPA-Se et SPA-Sv) par rapport aux turricules et galeries des modalités S, SA, SP, SPA (constante de Gompertz). L'inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP augmente le potentiel de minéralisation de l'atrazine au sein du sol. L'effet de la bactérie sur les quantités minéralisées est statistiquement validé par l'analyse MLG (tableau IV.6). Les quantités totales minéralisées au sein des

IV.2.2.c Quantification du nombre de copie des gènes *Atz A, B* et *C* par PCR en temps réel

Les gènes codant pour les trois premières enzymes intervenant dans la dégradation de l'atrazine (voie de dégradation hydroxyatrazine) ont été quantifiés par PCR en temps réel dans des microsites de sol échantillonnés à partir des microcosmes des quatre traitements (S, SA, SP et SPA).

Les quantités de gènes *AtzA, B* et *C* dans les microsites suivent sensiblement le même profil (figure IV.15).

Dans S et SA, les gènes sont inférieurs à 100 000 copies gr⁻¹ sol dans tous les microsites de sol (S-Se, Sv-Se, Sv-Ga, Sv-Tu et Sv-En) sauf pour *AtzA* dans l'endentes et pour des échantillons à forte variabilité. Le pré-traitement à l'atrazine n'affecte pas les quantités de gènes *AtzB* et *C* (S versus SA et MLG tableau IV.7).

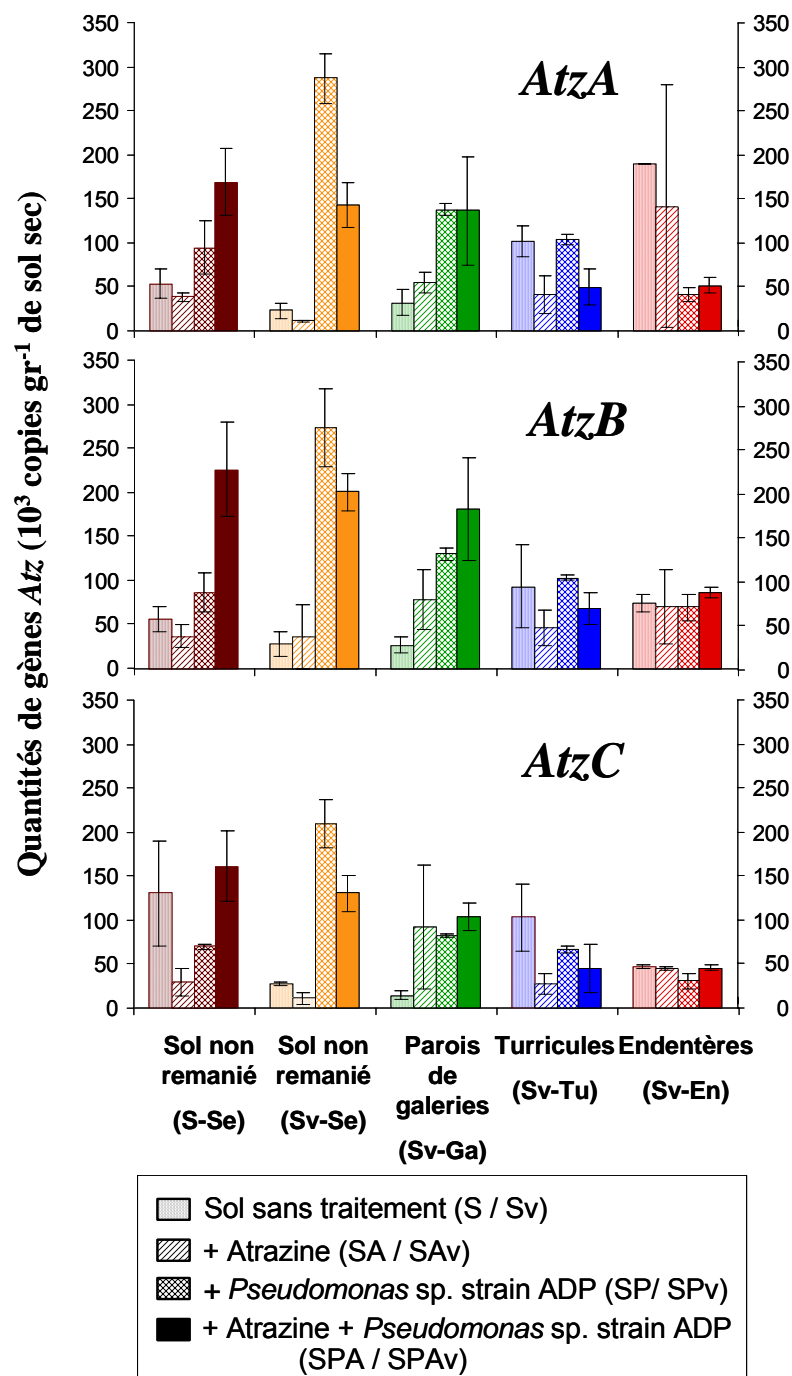


Figure IV.15 Quantités de gènes *AtzA*, *B* et *C* dans les microsites de sol (sol non remanié en présence et en absence de vers S-Se et Sv-Se, parois de galeries Sv-Ga, turricules Sv-Tu et endentères Sv-En) échantillonnés à partir des microcosmes des 4 modalités S, SA, SP et SPA.

Tableau IV.7 Modèles linéaires généralisés des quantités de gènes *AtzA*, *B* et *C* en fonction des facteurs pré-traitement à l'atrazine (A)atrazine, inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (P), microsites de sol (M) et de leurs interactions.

	<i>Atz A</i>		<i>Atz B</i>		<i>Atz C</i>	
	F	P	F	P	F	P
Atrazine	6,59	0,015	1,19	0,284	1,34	0,254
<i>Pseudomonas</i> sp, Adp	35,85	0,000	115,54	0,000	30,51	0,000
Microsites	2,84	0,038	6,88	0,000	6,90	0,000
A*P	0,00	0,976	1,86	0,181	3,65	0,064
A*M	5,70	0,001	7,07	0,000	6,29	0,001
P*M	32,01	0,000	19,77	0,000	15,21	0,000
A*P*M	4,97	0,003	6,14	0,001	10,22	0,000

Dans SP et SPA, les quantités de gènes sont supérieures (de 70 000 à 287 000 copies.gr⁻¹ sol) dans le sol non remanié (S-Se et Sv-Se). L'inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP a augmenté les quantités de gènes *AtzA*, *B* et *C* dans les microsites (MLG : effet du facteur *Pseudomonas*, tableau IV.7). L'effet de *Pseudomonas* est indépendant du pré-traitement atrazine (MLG : pas d'effet atrazine ni d'interaction entre les facteurs atrazine et *Pseudomonas*, tableau IV.7). Les quantités de gènes *Atz* dans les parois de galeries sont intermédiaires (environ 150 000 copies.gr⁻¹ sol) aux quantités mesurées dans le sol non remanié et à celles mesurées dans les turricules et les endentères (environ 50 000 copies gr⁻¹ sol). L'effet microsite est statistiquement validé par l'analyse MLG traduit l'action des vers au sein d'un sol inoculé avec la bactérie dégradante. Durant l'ingestion et dans une moindre intensité lors du creusement de galeries, les lombriciens sont responsables d'une diminution des quantités de gènes *Atz* dans le sol.

RESUME : l'action des vers sur la communauté dégradant l'atrazine (*Pseudomonas* sp. ADP) inoculée dans les microcosmes se traduit par un ralentissement de la minéralisation d'au moins 50 %-75 % (données brutes-données modélisées, Gompertz). En revanche le sol non remanié et en présence de *Pseudomonas* sp. ADP présente une forte minéralisation de l'atrazine (80 % vs 20 %) du type des sols adaptés à la dégradation accélérée de l'atrazine. Malgré un niveau d'activité supérieur dans les turricules les galeries et les endentères, l'effet de la bio-augmentation (inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP) est ici réduit par l'action des lombriciens : les lombriciens restructurent les communautés bactériennes dans les turricules et les parois de galeries. De plus les quantités de gènes *AtzA*, *B* et *C* codant pour des enzymes responsables de la dégradation de l'atrazine sont inférieures dans ces microsites de sol créés par les lombriciens (+ endentère).

Le sol n'est pas initialement adapté à la dégradation accéléré de l'atrazine.

IV.3 Discussion

IV.3.1 La présence des lombriciens ralentit la minéralisation de l'atrazine

Nous avons montré à différentes échelles d'investigations spatiales (microcosme et mésocosme) et temporelles (cinétiques de 62, 86 et 174 jours) que la minéralisation effective de l'atrazine est ralentie en présence de vers. Ce ralentissement varie en fonction des tailles des dispositifs expérimentaux et du conditionnement du sol : - 24 % en microcosme avec du sol réhumecté (après 86 jours), - 8 % en microcosme avec du sol frais (après 62 jours) et - 4 % en mésocosmes au terrain (après 174 jours).

L'effet des lombriciens sur la minéralisation de l'atrazine dans les sols est toujours débattu puisque les rares résultats reportés dans la littérature sont contradictoires. Récemment Farenhorst *et al.* (2000a) ont observé une minéralisation inférieure de l'atrazine en présence de *Lumbricus terrestris* : - 32 % après 46 jours d'incubation à 12°C, dans 100 g de sol frais (13 % d'humidité) fréquemment mélangés et - 26 % après 68 jours d'incubation à 12°C, en colonnes de sol frais (sol d'humidité 13 %, ramenée à 25 % avant compaction). Notre étude appuie les observations de Farenhorst *et al.* (2000a). Les quantités d'atrazine minéralisées avec vers sont réduites de - 24 %, - 8 % et - 4 % respectivement en microcosmes après 86 et 62 jours et en mésocosmes, après 174 jours. A l'inverse, d'autres auteurs rapportent que les lombriciens augmentent la minéralisation de l'atrazine. Meharg (1996) observe un doublement de la minéralisation de l'atrazine en présence de l'espèce anécique *L. terrestris*, après 4 semaines, à température ambiante (15-23°C) dans des microcosmes de 40 g de sol. Plus récemment une minéralisation supérieure de + 47 % a été démontrée avec une autre espèce anécique *Aporrectodea longa* (34 % vs 0,7 % avec vs sans vers) après 4 semaines dans des microcosmes de 2 kg (Gevao *et al.*, 2001).

Ces contradictions ne sont probablement qu'apparentes et principalement dues à des différences dans les durées des expérimentations : une minéralisation accrue de l'atrazine en présence de vers à courte échelle (moins de un mois) (Meharg, 1996 ; Gevao *et al.*, 2001) ; une minéralisation ralentie au delà d'un mois (Farenhorst *et al.*, 2000a ; notre étude). Des différences de protocoles rendent difficiles les comparaisons. Les microcosmes constitués soit de flacons de sol, soit de colonnes de sol compactées produisent des écarts dans le ratio biomasse des vers / quantité de sol ainsi que dans le comportement des vers (1,27 g / 40 g

versus 3,63 g / 1,5 Kg respectivement Meharg (1996) et notre étude). En outre la compacité du sol détermine l'intensité de bioturbation du sol par les vers (Binet *et al.*, 1997).

De même, les caractéristiques du sol utilisé peuvent créer des différences entre les expérimentations. L'atrazine est une molécule basique facilement protonée, sensible au pH et qui manifeste une forte réactivité moléculaire pour la matière organique et la fraction argileuse de la matrice de sol (Khan, 1978 ; Hance, 1988 ; Laird *et al.*, 1992). Selon les études de Meharg (1996) et de Gevaio *et al.* (2001), l'augmentation de la minéralisation en présence de vers était obtenue pour des sols riches en matière organique (sol d'un horizon de forêt de hêtre et de pins, et sol cultivé, avec 9,9 % de matière organique) mais avec des pH différents (4,4 et 6,8). Le ralentissement de la minéralisation en présence de vers observé dans les deux expérimentations avec des colonnes de sol compactées (Farenhorst *et al.*, 2000a ; notre étude) ont été obtenues avec des sols cultivés limoneux similaires, légèrement acides (6,35 et 6,40) et de faibles quantités de matières organiques (1,63 % et 1,80 %). Meharg (1996) explique la minéralisation plus rapide en présence de vers par une plus grande biodisponibilité de l'atrazine due à sa plus faible adsorption et rétention dans le sol enrichi en mucus déposé par les vers. Gevaio *et al.* (2001) ont, quant à eux, suggéré une augmentation de l'activité microbienne et surtout de celle des bactéries capables de minéraliser l'atrazine. Ces bactéries faisant partie de la communauté bactérienne du tube digestif des vers *A. longa*, auraient été ajoutées durant le transit. Ainsi pour comprendre les mécanismes fins par lesquels les lombriciens agissent, deux facteurs doivent être considérés : i) les changements en substrat carboné qui se produisent via les activités lombriciennes et qui peuvent être déterminants selon la teneur en carbone du sol initial et aussi ii) les changements dans la taille de la microflore capable de minéraliser l'atrazine non mesurées dans les expérimentations citées.

Parmi nos expérimentations, le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine en présence de vers est moindre dans Exp. 2 que dans Exp. 1 (- 8 % vs- 24 %). Pour Exp. 2, les turricules ne sont pas collectés ni retirés en cours d'incubation (pas de sur-activité des vers) et surtout le sol utilisé est frais (pas sur-activité microbienne liée au flush), ce qui explique vraisemblablement le ralentissement plus faible. Même s'il est moindre, le ralentissement de la minéralisation demeure effectif dans Exp. 2, après 62 jours (- 8 %) et au terrain en mésocosmes après 174 jours (- 4 %). Les facteurs limitants la métabolisation des pesticides peuvent être microbiens ou chimiques (Scheunert, 1992). Il est désormais bien admis que la présence de lombriciens change les conditions microbiennes du sol. En effet, ces derniers modifient la structure des communautés de micro-organismes en enfouissant la litière où ils se développent, en s'alimentant de certains champignons ("broutage") et en bioturbant le sol (Cooke et Luxton, 1980 ; Binet, 1993). Les quantités et la diversité des micro-organismes sont modifiées dans les turricules (Parle, 1963a ; Shaw et Pawluk, 1986a ; Scheu, 1987 ; Tiunov et Scheu, 2000a,b) et les galeries (Tiunov et Dobrovolskaya, 2002 ; Tiunov et Scheu, 1999). Les interactions que les

vers entretiennent avec les micro-organismes ont probablement joué un rôle essentiel dans notre étude.

L'action des vers sur les micro-organismes se traduit majoritairement par une modification du rapport de densité de champignons et de bactéries dans le milieu, en faveur des bactéries (Blair *et al.*, 1995). Zhang et Hendrix (1995) ont développé l'hypothèse qu'en modifiant le ratio bactéries / champignons, les lombriciens pouvaient favoriser la minéralisation par rapport à un sol sans vers. Deux essais ont été entrepris pour pallier les différences de développement de champignons filamenteux saprophages à la surface de la litière entre les microcosmes sans vers et avec vers (Binet, 1993) : un enfouissement partiel de la litière sur la surface du sol (Exp 1) et un enfouissement dans une fausse galerie (Exp 2). Entre les deux méthodes aucune différence n'a été observée concernant le développement de champignons en surface. De même, aucune différence dans les quantités d'atrazine minéralisées n'est observée entre ces deux méthodes (figure IV.2 et IV.4). Le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine ne semble donc pas lié à un développement anarchique de champignons en surface dans les microcosmes sans vers. Toutefois il est vraisemblablement lié à la restructuration des communautés de microorganismes par les vers. Il convient donc de s'intéresser aux microsites de sol créés par les vers de manière à appréhender l'hétérogénéité du processus de minéralisation de l'atrazine.

IV.3.2 Hétérogénéité spatiale et temporelle de la minéralisation de l'atrazine, à l'échelle du microsite

Nous avons cherché à expliquer le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine en présence de vers observé à l'échelle des microcosmes. Dans ce but, nous avons échantillonné le sol des dispositifs de manière à définir des microsites de sol représentatifs de l'activité des vers et sur lesquels les mesures ont été ciblées. Nous avons ensuite mesuré la minéralisation potentielle de l'atrazine dans chacun des microsites de sol qui reflète les capacités des micro-organismes du sol à dégrader. La minéralisation potentielle est obtenue par une double application d'atrazine et des conditions d'incubation optimales des microsites de manière à maximiser le processus de minéralisation.

Les turricules de 10 jours d'âge minéralisent au moins deux fois plus que le sol non remanié de surface (0-5 cm). Avec le vieillissement, l'écart diminue et s'inverse. La minéralisation dans les turricules est alors inférieure (- 9 % à - 48 % pour des âges de 30 à 62 jours) et équivalente à celles très faibles mesurées dans le sol non remanié en profondeur. Le sol non remanié de surface (0-2 et 2-5 cm) minéralise des quantités supérieures d'atrazine que le sol situé en

profondeur (5-10 et 10-15 cm). D'autre part le sol de surface minéralise davantage d'atrazine en absence de vers qu'en leur présence.

Différentes hypothèses peuvent expliquer le ralentissement de la minéralisation avec le vieillissement des turricules.

La diminution d'atrazine minéralisée dans les turricules avec l'âge pourrait correspondre à un épuisement de la molécule dans le sol. Seulement 6,3 % et 5,8 % de l'atrazine appliquée sur les colonnes sans et avec vers ont été minéralisés, après 62 jours. Il ne s'agit donc pas d'un épuisement de la molécule.

Si la minéralisation est moindre avec l'âge des turricules, mais que la molécule y est toujours présente, il est possible que la disponibilité ou l'accessibilité de la molécule soit en cause. La quantité d'atrazine non extractible augmenterait et sa biodisponibilité pour la dégradation par les micro-organismes diminuerait. Nous avons montré (chapitre V, figure V.2 et V.3.) que si les quantités d'atrazine diminuent dans les turricules, l'atrazine disponible y est encore suffisamment abondante.

Puisque la molécule est présente et disponible, la diminution de minéralisation dans les turricules par rapport au sol non remanié peut alors correspondre à une activité microbienne limitée dans le microsite.

Une humidité moindre du sol peut limiter l'activité microbienne et donc la minéralisation de l'atrazine. Malgré les apports d'eau en surface de microcosmes, les turricules s'assèchent en vieillissant. On peut s'interroger sur le rôle de l'assèchement lors du vieillissement des galeries et turricules dans le ralentissement de la minéralisation. En effet la galerie est un milieu moins exposé que le turricule et s'assèche donc moins vite. Or les galeries comme les turricules ont une activité microbienne plus élevée (respiration) mais minéralisent moins l'atrazine que le sol non remanié de surface (sauf à 10 jours d'âge). De plus ce sol en surface est également très exposé à l'assèchement. Puisque la minéralisation du carbone total est supérieure au sein des microsites turricules et galeries, ce ne sont pas des conditions défavorables aux micro-organismes qui sont en jeu mais des conditions défavorables à la dégradation de l'atrazine, à savoir sa disponibilité ou la capacité dégradante de la microflore.

Si les conditions nécessaires au développement des activités microbiennes sont réunies, il se peut que les communautés microbiennes dégradantes soient affectées par l'action de bioturbation des lombriciens dans les microsites turricules et galeries.

L'expérimentation avec inoculation de la bactérie dégradant l'atrazine, *Pseudomonas* sp. ADP permet de préciser les mécanismes du ralentissement de la minéralisation de l'atrazine en

présence de vers. La compartimentation du sol par le ver accroît davantage l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la dégradation de l'atrazine.

Au cours de cette expérimentation nous avons montré que les communautés bactériennes sont structurées lors de l'ingestion du sol ou de la construction des galeries. Le sol inoculé retrouvé dans les turricules et les galeries minéralise des quantités équivalentes d'atrazine au sol non-inoculé par *Pseudomonas* sp. ADP. De même, les quantités de gènes *AtzA*, *B* et *C* codant pour des enzymes responsables de la dégradation de l'atrazine, sont équivalentes dans les turricules à celles dans le sol non inoculé. Pour les galeries, les quantités sont intermédiaires. La taille de la communauté *Pseudomonas* sp. ADP inoculée (obtenue par séquençage et analyse en T-RFLP, données non présentées ici) est inférieure dans les galeries et surtout dans les endentères et les turricules. C'est l'ingestion et le passage via le tube digestif des vers qui semble altérer la communauté de la bactérie dégradante, *Pseudomonas*. Les turricules sont constitués des communautés de micro-organismes qui résistent au passage au travers du tube digestif et qui colonisent ensuite le microsite (Dash *et al.*, 1986 ; Spiers *et al.*, 1986 ; Brown, 1995). La perte de capacité de la communauté dégradant l'atrazine serait donc due à une altération de la taille de la communauté *Pseudomonas* sp. ADP.

Sur les parois de galeries, du sol ingéré peut-être déposé mais il ne constitue pas l'ensemble du sol des parois. Sans ingestion de sol, la bactérie dégradante perd également sa capacité dans le sol des parois de galeries. Il semblerait donc qu'en plus de sa taille, l'activité de la communauté *Pseudomonas* sp. ADP soit également altérée au sein des microsites remaniés par les lombriciens.

Le niveau d'activité, déterminé par le ratio de l'ARN par rapport à l'ADN dans les microsites galeries et turricules, est supérieur à celui du sol non remanié par le ver (galeries, turricules et endentères), ce qui est concordant avec les données supérieures de minéralisation du carbone total, dans les microsites turricules et galeries. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que c'est l'activité de *Pseudomonas* sp. ADP qui semble diminuée dans les microsites remaniés par les vers par rapport à d'autres communautés. *Pseudomonas* sp. ADP utilise l'atrazine comme source d'azote pour son développement (Mandelbaum *et al.*, 1995).

Les teneurs en ammonium (NH_4^+) et en nitrates (NO_3^-) sont supérieures dans les turricules (Lunt et Jacobson, 1944 ; Parle, 1963b ; Rouelle et Randriamamonjizaka, 1983 ; Tiwari *et al.*, 1989) et dans les galeries (Syers et Springett, 1983 ; Binet, 1993). Les teneurs en ammonium sont importantes dans les turricules frais mais la nitrification rapide se traduit par des niveaux stables de NH_4^+ et de NO_3^- dans les turricules secs (Decaens *et al.*, 1999). Les teneurs en NO_3^- sont multipliées par 15 dans les turricules de *Lumbricus rubellus* (Chaoui *et al.*, 2003). NH_4^+ et NO_3^- sont supérieurs de 24 % et 41 % dans les galeries de *L. terrestris* au laboratoire (Parkin et Berry, 1999). Parmelee *et al.* (1998) rapportent que l'excrétion de composés azotés dans l'urine

et le mucus peut apporter une source labile d'azote aux micro-organismes. La quantité d'azote dans l'urine principalement sous la forme d'ammonium et d'urée, avec une faible proportion d'allantoïne et d'acide urique, représente la moitié des quantités totales sécrétées et relarguées au travers de la paroi intestinal et des téguments. Les quantités d'azote sécrétées dans l'urine seraient supérieures à celles sécrétées dans le mucus (Laverback, 1963 dans Lavelle et Spain, 2001). L'apport d'azote dans le sol par voie métabolique (*i.e.* produits d'excrétion) a été estimé à $21 \mu\text{g d'N.g}^{-1}.\text{(pf) ver}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ pour *L. terrestris* (Binet et Tréhen, 1992). Le mucus est composé de mucoprotéines avec un ratio C / N faible de 3,8 (Scheu, 1991). L'urée a une structure moléculaire proche de l'allophanate (métabolite de dégradation de l'atrazine) et l'ammonium est le métabolite final de la dégradation de l'atrazine (chapitre I, figure I.4). Des travaux ont montré que l'enrichissement en azote minéral diminuait significativement la minéralisation de l'atrazine dans les sols (Entry *et al.*, 1993 ; Alvey et Crowley, 1995 ; Abdelhafid *et al.*, 2000a,b). L'utilisation d'azote minéral plutôt que l'azote de l'atrazine contribuerait à l'inhibition de la minéralisation de l'atrazine après apport (Alvey et Crowley, 1995). L'enrichissement en ammonium et en urée dans les turricules et les galeries peut donc constituer une alternative à l'utilisation de l'atrazine comme une source d'azote. L'hypothèse émise est liée à la disponibilité de l'azote dans les microsites : l'azote n'étant plus limitant pour la bactérie dans les turricules et les galeries, la dégradation de l'atrazine y serait inférieure puisqu'elle n'est plus utilisée comme source d'azote. Les gènes *AtzABCDEF* sont exprimés à un niveau de base et régulés en amont en réponse au traitement à l'atrazine. Les modes d'expression sont différents chez *Pseudomonas ADP* et *Chelatobacter Heintzii* suggérant que l'hôte influence l'expression basale des gènes *Atz* modulant ainsi l'expression de la fonction de dégradation de l'atrazine (Devers *et al.*, 2004). Le ralentissement de la dégradation de l'atrazine dans les biostructures en présence de *Pseudomonas sp. ADP*, pourrait être lié au contrôle de l'expression des gènes *Atz*. Pour vérifier cette hypothèse, et connaître l'influence de l'apport d'azote dans le ralentissement de la minéralisation de l'atrazine dans les biostructures, il faudrait mesurer de manière simultanée dans les turricules et les galeries i) les cinétiques de la minéralisation de l'atrazine ii) la taille de la communauté bactérienne *Pseudomonas sp. ADP*, iii) les quantités de gènes *Atz* et iii) l'évolution des teneurs en NH_4^+ et NO_3^- .

IV.3.3 Minéralisation accélérée

Les taux de minéralisation obtenus dans nos expérimentations (15% maximum) sont dans l'ordre de grandeur des taux faibles observés pour l'atrazine: autour de 20 % après 3 mois dans le sol de surface au champ (Klint *et al.*, 1993 ; Meharg, 1996) et qui indiquent que l'atrazine est relativement persistante dans l'environnement. Ils sont également satisfaisants en comparaison avec des dégradations extrêmement lentes obtenues dans d'autres études impliquant les vers

de terre : moins de 3% sur 68 jours à 12°C dans des colonnes compactés avec *L. terrestris* (Farenhorst *et al.*, 2000a) et même moins de 1 % de l'atrazine appliquée, après 4 semaines à température ambiante en microcosmes-flacons avec *L. terrestris* aussi (Meharg, 1996).

L'adaptation des sols à la dégradation de l'atrazine a été observée sur des sols sous culture permanente de maïs ayant subi des applications annuelles d'atrazine (Barriuso et Houot, 1996 ; Abdelhafid *et al.*, 2000a,b ; Houot *et al.*, 2000). L'adaptation des sols à la dégradation de l'atrazine est majoritairement observée pour des sols cultivés de pH supérieur à 6,5 ; en deçà de pH 6.5, la minéralisation est moindre (Houot *et al.*, 2000). Dans ces cas d'adaptation, la dégradation de l'atrazine est rapide : les taux de minéralisation potentielle de l'atrazine atteignent alors 60 à 80 % de l'atrazine initialement appliquée, après 35 jours (Barriuso et Houot, 1996 ; Houot *et al.*, 2000).

Au cours de l'Exp. 2, après double application d'atrazine, les taux de minéralisation mesurés atteignent parfois mais rarement ces pourcentages, la réponse est beaucoup moins rapide. L'incubation effectuée seulement à 20°C pendant 26-29 jours peut expliquer les plus faibles quantités d'atrazine minéralisées. Le pH du sol initial peut être aussi en cause ; il est faiblement acide (pH 6.4) en dessous de la valeur 6.5 qui semble être une limite à la mise en place de la dégradation accélérée de l'atrazine.

Pour l'Exp. 3, le pré-traitement à l'atrazine n'accélère pas la minéralisation de l'atrazine dans le sol non remanié ni dans les turricules et les galeries (< 25 % de l'atrazine initiale, à 20°C, en 27 jours). Le sol est le même que précédemment (Exp. 2). Nous confirmons donc là que le sol utilisé dans l'ensemble de l'étude n'est pas adapté à la dégradation accélérée de l'atrazine. Pour rappel, l'incubation des microsites dans l'Exp. 3 (30 jours) correspond à la durée d'incubation des microsites de 11 jours d'âge dans l'Exp. 2 (figure IV.7.a). La minéralisation potentielle dans les turricules et les galeries est beaucoup plus importante dans l'Exp. 2 que l'Exp 3. Dans Exp3, le potentiel des microsites semble affecté et les cinétiques obtenues correspondent plutôt à celles observées après 50 jours d'âge. La différence entre les deux expérimentations provient sans doute des différences méthodologiques. Respectivement, les microsites sont utilisés frais puis déstructurés dans l'Exp. 2 alors qu'ils ont été séchés à l'air libre, tamisé (4 mm) puis réhumidifiés dans l'Exp. 3, avant l'application d'atrazine et leur incubation. Le potentiel de dégradation du sol a pu être réduit par le séchage par comparaison avec l'incubation de sol frais (notre Exp. 2 et expérimentations de Barriuso et Houot, 1996 ; Abdelhafid *et al.*, 2000a,b ; Houot *et al.*, 2000). Le sol utilisé a été récolté au champ dans le même horizon de surface fin septembre pour l'Exp. 2 et fin janvier pour l'Exp. 3. Barriuso et Houot (1996) ont observé que les variations saisonnières pouvaient affecter l'activité microbienne de dégradation. Cependant tous les microsites ont subi le même conditionnement au sein d'une même expérimentation. Si les différences méthodologiques peuvent expliquer les écarts dans les cinétiques de minéralisation potentielle entre nos expérimentations (2 et 3), elles

ne remettent pas en question les différences mesurées dans les dispositifs bioturbés par les vers et ceux exempt d'activités lombriciennes.

**CHAPITRE V MOBILITE ET DISPONIBILITE DE
L'ATRAZINE DANS LE SOL : ROLE REGULATEUR DES
LOMBRICIENS**

Au cours de cette partie nous quantifierons l'action des lombriciens sur la distribution de l'atrazine et de ses métabolites de dégradation dans le sol ainsi que sur sa disponibilité par la recherche de résidus non extractibles dans les structures mises en place par le ver en comparaison au sol non remanié. La circulation de l'herbicide et de ses métabolites au travers des dispositifs d'échelles différentes sera également étudiée en présence et en absence de vers.

V.1 Redistribution et disponibilité de l'atrazine

V.1.1 A l'échelle du microcosme

Les vers sont responsables d'une redistribution de l'atrazine dans le sol (figure V.1).

Quantité de radioactivité ^{14}C (KBq.g⁻¹ sol)

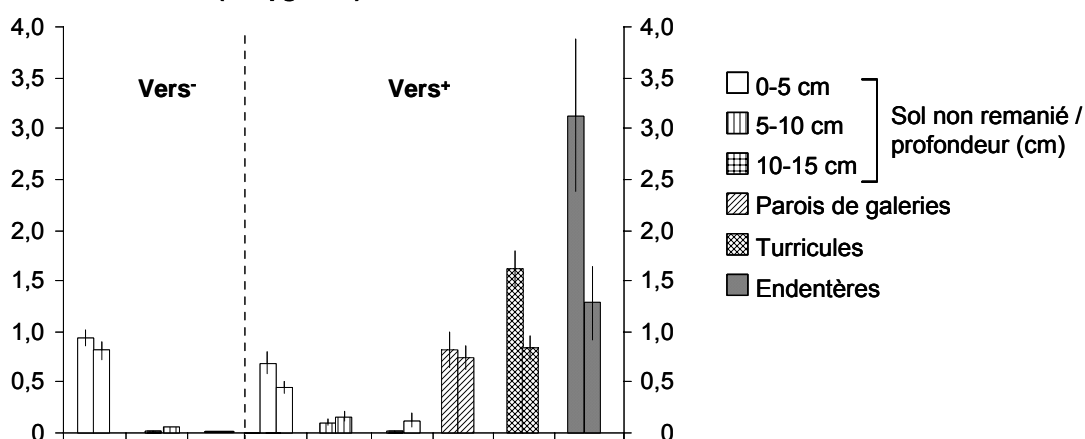


Figure V.1 Radioactivité totale par gramme de sol retrouvée au sein des microsites de sol (sol non remanié des profondeurs 0-5 cm, 5-10 cm et 10-15 cm en présence et en absence de vers, galeries, turricules et endentères) respectivement après 43 et 86 jours, au laboratoire, en microcosmes. Les barres indiquent les erreurs standards.

L'atrazine et ses métabolites (^{14}C) sont significativement plus concentrés dans le sol ingéré ou remanié par les vers que dans le sol non remanié des microcosmes (Kruskal-Wallis, 95%, $n = 3$ à 43 jours et 86 jours $p = 0,050$ parois de galeries, endentères et turricules *versus* sol non remanié à 5-10 et à 10-15 cm). Ces même différences ne sont toutefois plus significatives au niveau 0-5 cm (Kruskal-Wallis, 95%, $n = 3$, à 43 et 86 jours respectivement, $p = 0,513$ et

$p = 0,827$ pour les parois de galeries, $p = 0,050$ et $p = 0,513$ pour les turricules, $p = 0,050$ et $p = 0,513$ pour les endentères comparés au sol non remanié du niveau 0-5 cm). Si la concentration totale dans les galeries n'est pas significativement différente de celle du sol non remanié du niveau 0-5 cm sans vers, elle est au moins 52 et 11 fois supérieure à celle du sol non remanié plus en profondeur : 5-10 cm respectivement après 43 et 86 jours d'incubation (Kruskal-Wallis, 95%, $n = 3$, à 43 et 86 jours, $p = 0,050$ parois de galeries vs sol non remanié 5-10 et 10-15 cm).

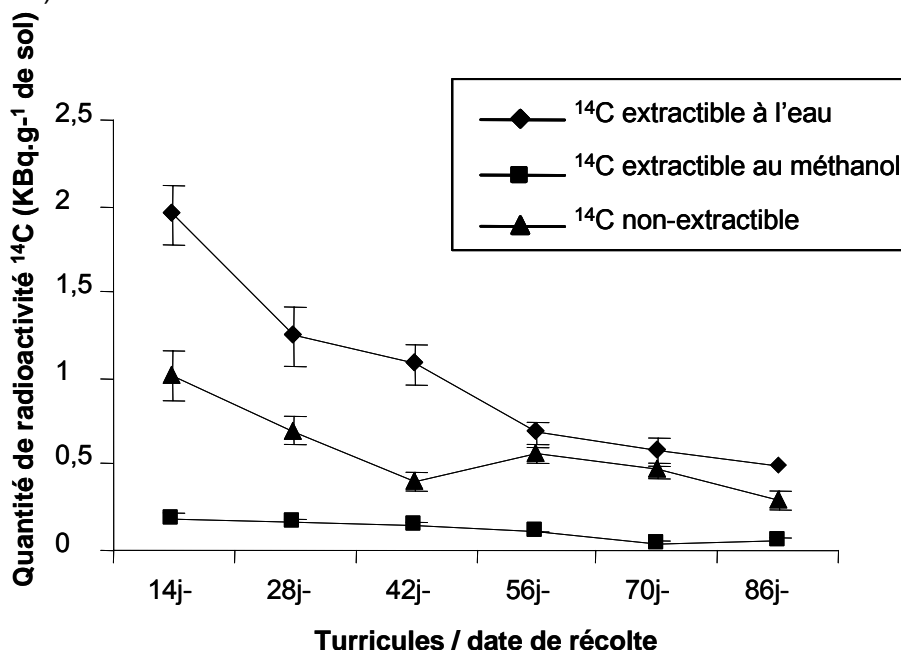


Figure V.2 Radioactivité extractible à l'eau, au méthanol et radioactivité non extractible à partir des turricules récoltés après 14, 28, 42, 56 70 et 86 jours d'incubation. Les erreurs standards sont indiquées.

Les quantités totales de radioactivité retrouvées par gramme de sol sont plus importantes dans les endentères puis dans les turricules collectés peu de temps après l'application d'atrazine (durant les 14 premiers jours). Les quantités dans les turricules collectés aux dates suivantes représentent la moitié de celles contenues dans les endentères après 43 jours d'incubation.

En présence de vers, l'atrazine et ses métabolites migrent davantage en profondeur dans les microcosmes de sol. En effet, sans vers la radioactivité est retrouvée principalement en haut de colonne (0-5 cm), peu en milieu de colonne (5-10) et quasiment pas au delà de 10 cm (10-15) ce qui indique une faible diffusion de l'herbicide et de ses dérivés dans le sol même après 86 jours d'incubation. En revanche après 86 jours d'incubation en présence de vers (*versus* absence de vers), 1,8 fois moins de radioactivité est retrouvée en haut de colonne, 2,5 fois plus entre 5 et 10 cm et 25,6 fois plus au delà de 10 cm, (Kruskal-Wallis test, 95%, $n = 3$, $p = 0,050$

pour 0-5 cm, 5-10 cm et 10-15 cm de profondeur après 86 jours d'incubation). Ces différences significatives démontrent une diffusion de l'herbicide et / ou de ses métabolites vers le sol non remanié, en présence de vers.

La migration de l'atrazine et de ses métabolites au sein du sol non remanié est également soulignée par une diminution de la radioactivité totale retrouvée en surface après 86 jours et par une augmentation des quantités aux profondeurs 5-10 et 10-15 cm (Kruskal-Wallis, 95%, $n = 3$, sans et avec vers respectivement, pour 0-5 cm $p = 0,275$ et $p = 0,127$; pour 5-10 cm $p = 0,050$ et $p = 0,827$; pour 10-15 cm $p = 0,050$ et $p = 0,275$).

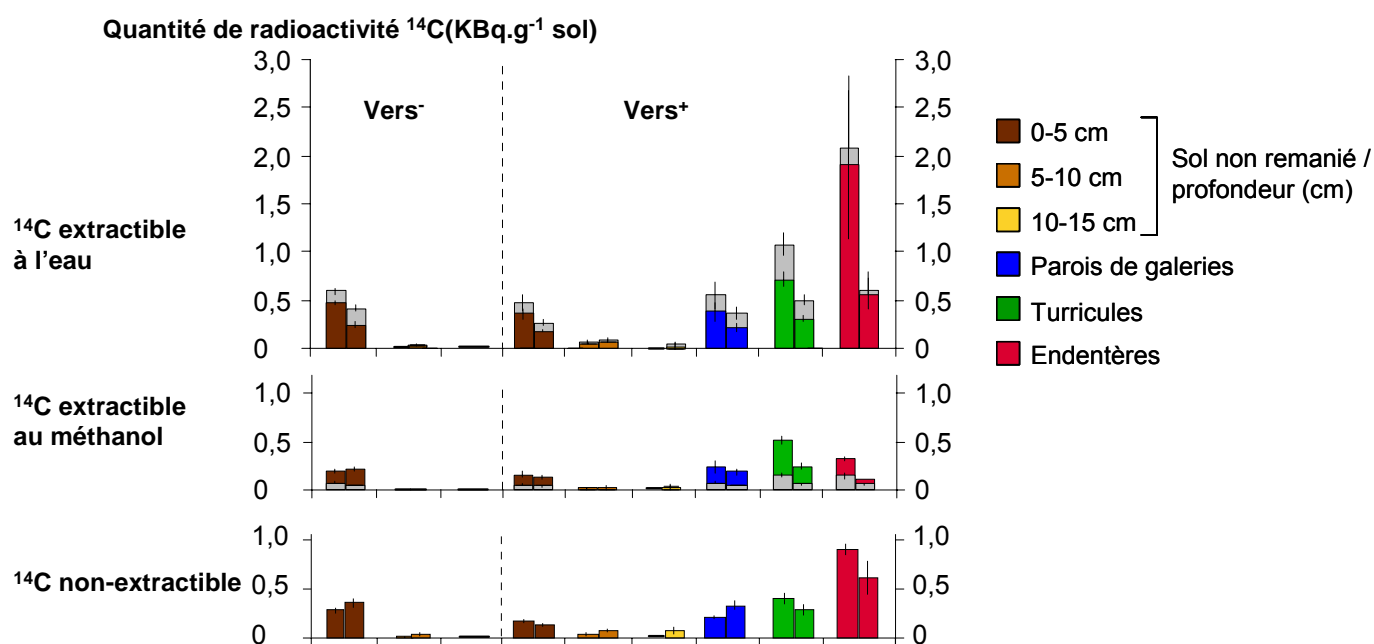


Figure V.3 Radioactivité extractible à l'eau, au méthanol et radioactivité non extractible à partir du haut, du milieu et du bas de la colonne de sol en présence et en absence de vers, à partir des parois de galeries, des turricules et des endentères des vers, après 43 et 86 jours d'incubation. Les barres indiquent les erreurs standards. (les données grisées sont celles avant correctif, voir chapitre II).

La radioactivité totale au sein des microsites de sol remaniés par les vers (turricules et galeries) diminue avec le temps d'incubation. Cette diminution est particulièrement visible avec les turricules dont les récoltes hebdomadaires sont regroupées par 14 jours sur les 86 jours d'incubation (figure V.2). Les quantités d'atrazine marquée au ^{14}C diminuent en effet quand le temps entre l'application et la récolte augmente et ce surtout pour la fraction d'atrazine extractible à l'eau par rapport à la fraction d'atrazine non extractible.

La concentration de résidus non extractibles est supérieure dans les biostructures. La proportion de ces résidus par gramme de sol augmente entre 43 et 86 jours d'incubation : dans le sol avec

vers, de 7 % dans les premiers centimètres de sol non remanié, de 10 % dans les turricules, de 18 % dans les parois de galeries et de 16 % dans les endentères, Ces différences indiquent que l'adsorption d'atrazine et de ses métabolites augmente avec le temps de contact dans la matrice de sol mais également dans les microsites de sol remaniés par les vers. En revanche les concentrations de résidus non extractibles diminuent avec le temps dans les turricules (figure V.2 et V.3). Les quantités d'atrazine non extractible dans le sol non remanié (0-5 cm) des colonnes sans vers sont supérieures à celles des colonnes avec vers (+ 5 % et + 12 % à 43 et 86 jours, respectivement) (figure V.3). Les trois fractions d'extractions (extractible à l'eau – extractible au méthanol – non extractible) suivent sensiblement les mêmes distributions dans les microsites de sol.

V.1.2 Au terrain, en mésocosmes

Quantité de radioactivité
(Bq.g⁻¹ de sol)

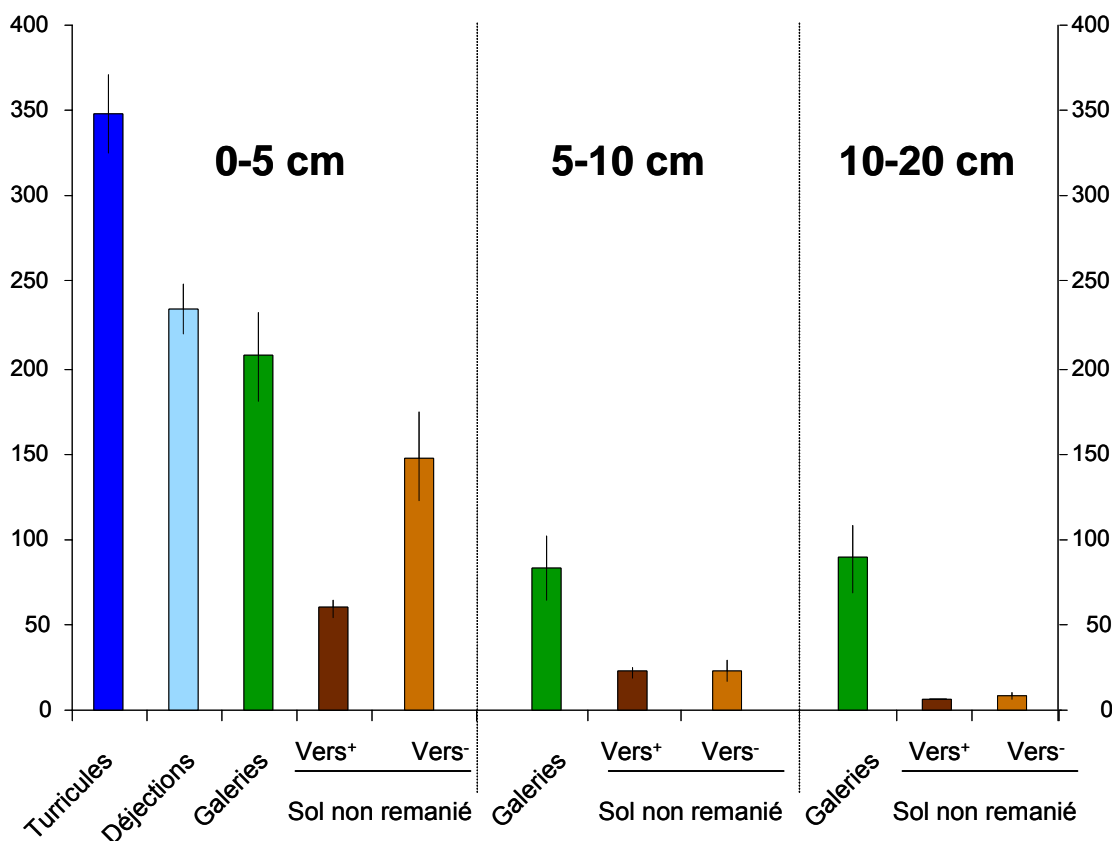


Figure V. 4 Radioactivité totale par gramme de sol retrouvée au sein des microsites de sol (sol non remanié en présence et en absence de vers, galeries pour les profondeurs 0-5, 5-10 et 10-20 cm, turricules en surface et déjections au sein du niveau 0-5 cm) après 174 jours, au terrain, en mésocosmes. Les barres indiquent les erreurs standards.

Au terrain les vers sont également responsables d'une redistribution de l'atrazine (figure V.4).

La radioactivité totale retrouvée est significativement plus concentrée dans le sol remanié par les vers par rapport au sol témoin (Mann-Whitney U-test, 95%, n = 6, par rapport au sol non remanié en présence de vers p = 0,0051 pour les turricules, p = 0,0051 pour les parois de galeries et p = 0,0142 pour les déjections).

Les quantités totales de radioactivité retrouvées par gramme de sol sont plus importantes dans les turricules (0,34 KBq.g⁻¹ de sol), puis les déjections (0,23 KBq.g⁻¹ de sol), les parois de

galleries (0,21 KBq.g⁻¹ de sol) et le sol non remanié (sans et avec vers : 0,15 et 0,06 KBq.g⁻¹ de sol).

Les quantités retrouvées dans les parois de galleries sont inférieures à celles dans les déjections d'une part (0-5 cm) et supérieures à celles dans le sol non remanié sans vers d'autre part ne sont pas significativement différentes (Mann-Whitney U-test, 95%, n = 6, pour le sol non remanié en absence de vers, p = 0,0927 pour les parois de galleries et p = 0,1098 pour les déjections). De même les quantités dans le sol non remanié présente des radioactivités significativement supérieures en absence de vers (Mann-Whitney U-test, 95%, n = 6, p = 0,0051).

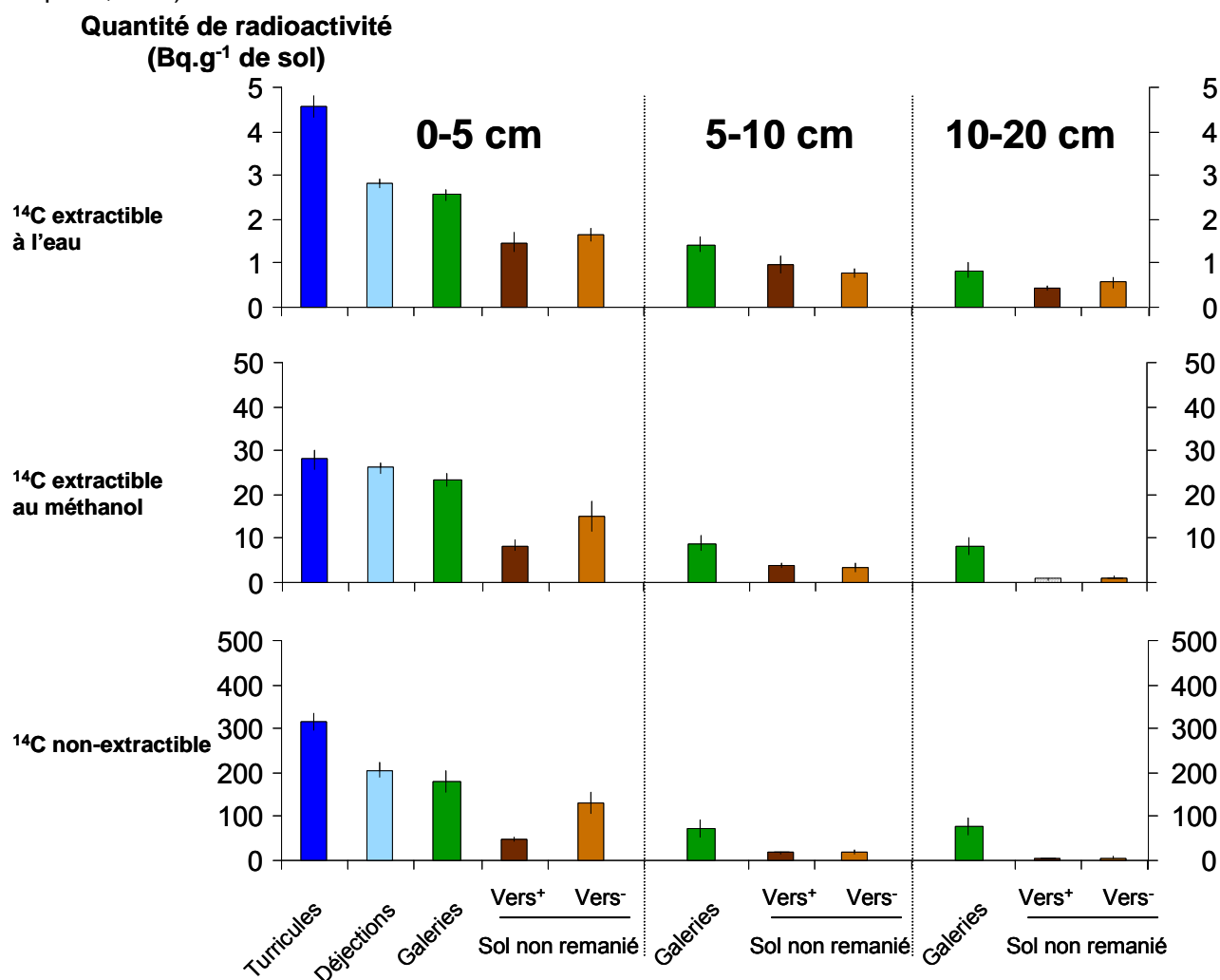


Figure V. 5. Radioactivité par gramme de sol extractible à l'eau, au méthanol et radioactivité non extractible à partir des microsites de sol (sol non remanié en présence et en absence de vers, galleries pour les profondeurs 0-5, 5-10 et 10-20 cm, turricules en surface et déjections au sein du niveau 0-5 cm) après 174 jours, au terrain, en mésocosmes. Les barres indiquent les erreurs standards.

A 5-10 cm, la radioactivité totale est 3,7 fois supérieure dans les parois de galeries par rapport au sol non remanié avec et sans vers et 10 à 15 fois supérieures à 10-20 cm (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, $p = 0,0081$ pour les parois de galeries vs le sol non remanié avec et sans vers des niveaux 5-10 cm et 10-20 cm).

L'atrazine et ses métabolites migrent en profondeur. Dans le sol non remanié, la quantité totale de radioactivité retrouvée par gramme de sol est supérieure dans les premiers centimètres de sol (0-5 cm) et décroît avec la profondeur. En effet elles sont 2,7 à 6,4 fois plus faibles du niveau 0-5 cm au niveau 5-10 cm (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, sans vers et avec vers respectivement, 0-5 cm vs 5-10 cm, $p = 0,0137$ et $p = 0,0051$) et 3,8 à 2,6 fois plus faibles du niveau 5-10 cm au niveau 10-20 ; (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, sans vers et avec vers respectivement, 5-10 cm vs 10-20 cm, $p = 0,0453$ et $p = 0,0051$). En revanche la quantité totale de radioactivité retrouvée dans les galeries des niveaux 5-10 et 10-15 cm est équivalente (83 et 88 Bq.g⁻¹).

S'agissant du sol non remanié les quantités totales sont équivalentes entre les modalités avec et sans vers pour le niveau 5-10 (22 vs 23 Bq.g⁻¹) et le niveau 10-15 cm (6 vs 9 Bq.g⁻¹) (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, 5-10 cm, $p = 0,9362$ et 10-20 cm $p = 0,3785$). Pour le niveau 0-5 cm, les quantités totales sont 2,5 fois supérieures en absence de vers (147 vs 60 Bq.g⁻¹), (Mann-Whitney U-test, 95%, $n = 6$, 0-5 cm, $p = 0,0051$).

En mésocosmes placés au terrain, la proportion de résidus non extractibles par gramme de sol correspond à 85 % de l'atrazine retrouvée après 174 jours. Les différences par gramme de sol sont aussi marquées et significatives que pour les quantités totales. D'une manière générale, les concentrations sont multipliées par 10 entre la fraction extractible à l'eau et au méthanol. Les concentrations de résidus non extractibles dans les différents microsites de sol sont respectivement 10 et 100 fois plus importantes que celles des fractions extractibles au méthanol et à l'eau. Au niveau 0-5 cm, 6,6 et 1,4 fois plus de radioactivité est retrouvée sous forme extractible dans les parois de galeries par rapport au sol non remanié avec et sans vers. Aux niveaux inférieurs, les rapports augmentent *i. e.* respectivement 4,1 et 3,9 à 5-10 cm et 17,1 et 11,1 à 10-20 cm. L'effet des parois de galeries dans l'adsorption de l'atrazine et de ses métabolites augmente avec la profondeur. Les quantités de radioactivité retrouvées décroissent également dans l'ordre fraction non-extractible > fraction extractible au méthanol > fraction extractible à l'eau, quelque soit le microsite considéré et les proportions sont conservées avec respectivement 85, 12 et 3 % (figure V.5).

V.1.3 Mécanismes impliqués dans la redistribution de l'atrazine

V.1.3.a Influence de la matière organique

La figure V.6 montre une corrélation positive (à 43 jours, $r = 0,8678$, $p = 0,05$ et à 86 jours, $r = 0,6290$, $p = 0,05$, figure V.6) entre les quantités de radioactivité non extractible (Bq.g^{-1} de sol) et de C (mg.g^{-1} de sol) dans les différents microsites de sol.

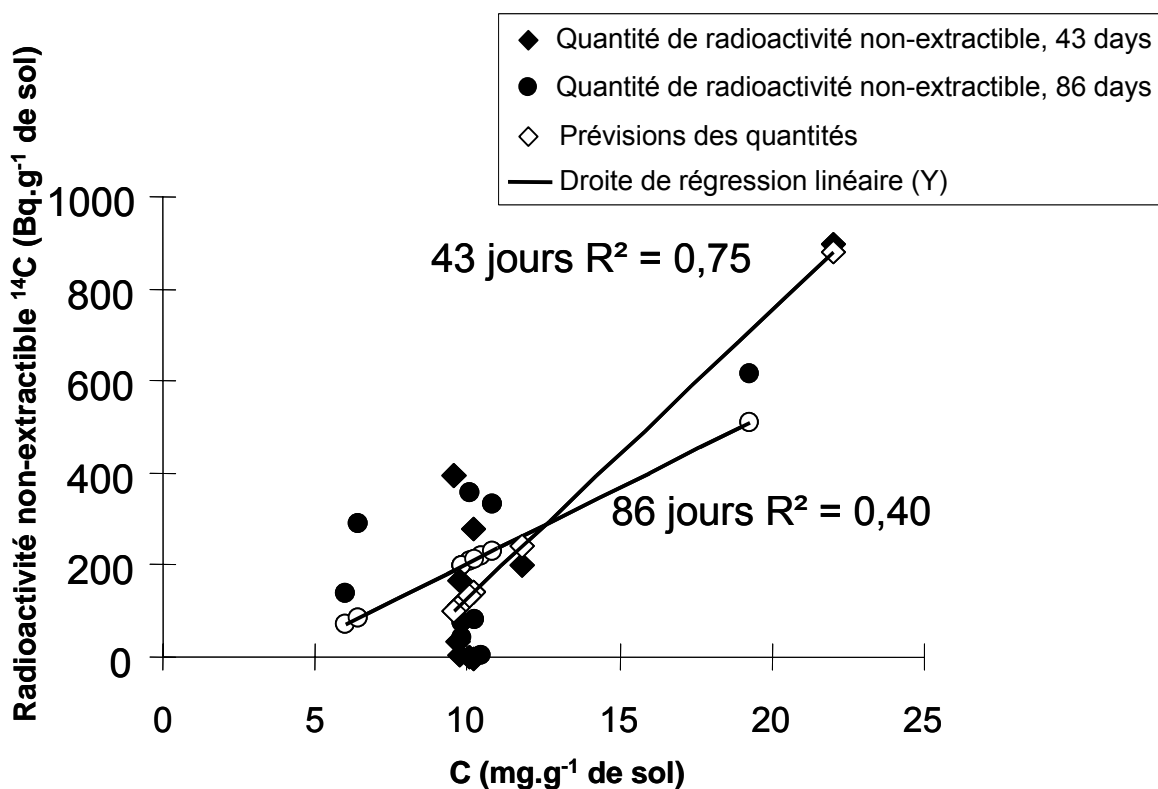


Figure V.6 Régression linéaire entre la radioactivité non-extractible et (Bq.g^{-1} de sol) et la quantité de C (mg.g^{-1} de sol).

La dépendance de l'adsorption de l'atrazine avec la quantité de carbone est moins marquée après 86 jours d'incubation qu'après 43 jours. Les teneurs en carbone, en azote et le C / N sont présentées en annexe 6.

V.1.3.b Répartition des résidus non-extractibles au sein des fractions de la matière organique

Les quantités totales de résidus non extractibles sont supérieures après 86 jours d'incubation et en particulier sur le sol environnant. Ceci correspond à une augmentation de la quantité de résidus au sein des trois fractions à savoir les acides fulviques, humiques, et la fraction non-extractible humine (figure V.7). La quantité de résidus liés au sein des acides fulviques est supérieure à celle liée aux autres fractions sauf pour les turricules récoltés après 43 jours et sa proportion augmente avec le temps (respectivement à 43 et 86 jours, pour le sol environnant 52 vs 54 % et pour les turricules 36 vs 56 %). La quantité d'atrazine liée aux acides humiques augmente après 86 jours. En proportion, les résidus d'atrazine et de ses métabolites associés à l'humine diminue de 43 à 86 jours (respectivement à 43 et 86 jours, pour le sol environnant 31 vs 23 % et pour les turricules 48 vs 19 %), à l'inverse des quantités de résidus associés aux acides fulviques.

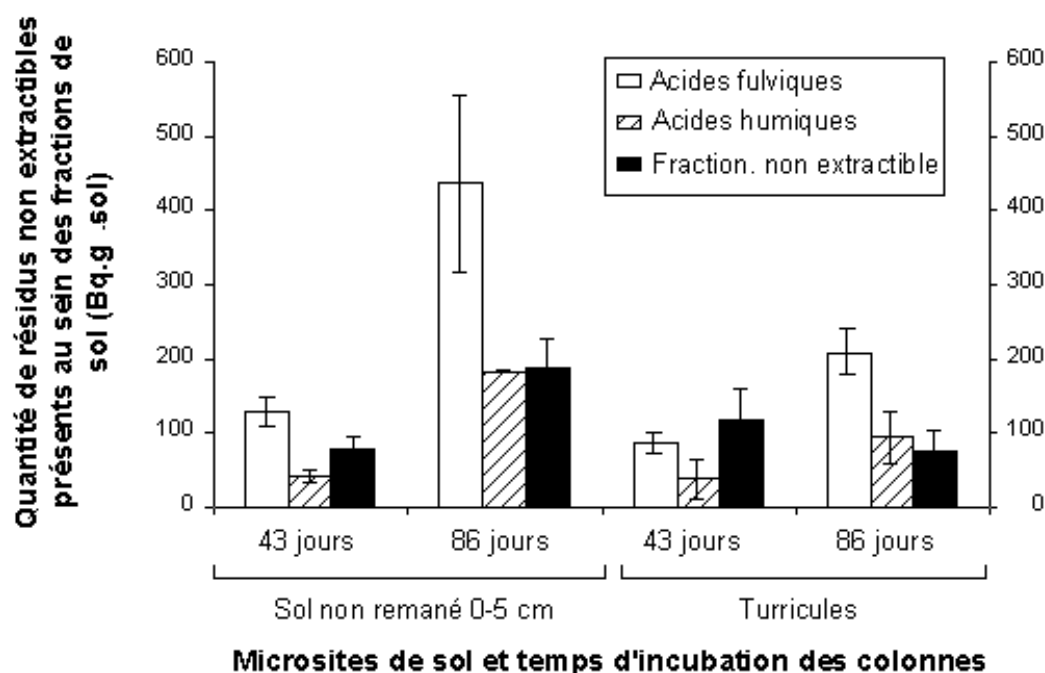


Figure V.7 Répartition des résidus non extractibles de l'atrazine au sein des acides humiques et fulviques et de l'humine dans les microsites de sol des turricules et dans le sol non remanié par les vers, prélevé sur les 5 centimètres de surface, issus de microcosmes incubés durant 43 et 86 jours. Les barres indiquent les erreurs standards.

RESUME : l'atrazine est plus adsorbée sur les compartiments liés aux lombriciens, à partir de microsites de sol échantillonnés au laboratoire en microcosmes et au terrain en mésocosmes. L'adsorption d'atrazine est particulièrement élevée dans les endentères et les turricules. Dans les biostructures lombriciennes, elle décroît dans l'ordre endentères, turricules, déjections, parois de galeries. Elle décroît avec la profondeur mais les galeries concentrent plus d'atrazine que le sol non remanié du même niveau. Les quantités de résidus non extractibles sont plus élevées dans les biostructures. Les proportions des différentes fractions de l'atrazine dans le sol suivent le même profil que les concentrations totales.

V.2 Voies de dégradation de l'atrazine au sein des microsites de sol

D'après l'analyse des métabolites de dégradation dans les microsites de sol (figure V.8), les proportions d'hydroxyatrazine sont supérieures dans les compartiments liés au vers soit 32 % dans les turricules, 32 % dans les galeries et 0 et 21 % dans le sol environnant en présence et en absence de vers respectivement. Les autres métabolites sont retrouvés en faible proportion : moins de 7 % pour le DEA et le DIA et entre 5 et 10 % pour l'atrazine dans les microsites liés au vers alors qu'atrazine, DEA et DIA sont retrouvés en proportion sensiblement égale et supérieure (10 à 20 %) au sein du sol environnant.

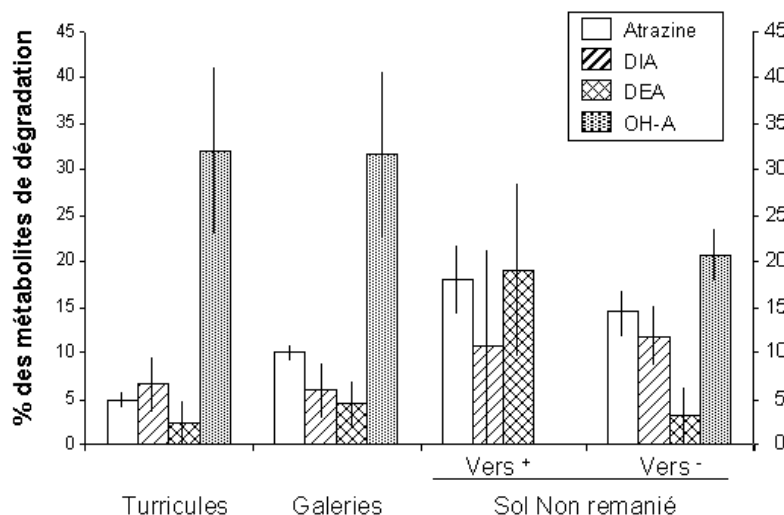


Figure V.8 Pourcentage des métabolites de dégradation de l'atrazine retrouvés dans la fraction extractible au méthanol des microsites de sol obtenus à partir des mésocosmes placés 174 jours au terrain (turricules, galeries du niveau 0-5 cm et du sol non remanié par les vers du niveau 0-5 cm en présence et en absence de vers). Les barres indiquent les erreurs standards.

V.3 Mobilité de l'atrazine

V.3.1 Flux d'eau et d'atrazine dans le sol

V.3.1.a Volumes d'eau lixiviés

Au laboratoire, en microcosmes les percolats ont été collectés, analysés et témoignent ainsi des quantités d'eau qui transitent au travers de la colonne. Sur les 86 jours d'incubation, les volumes percolés sont significativement supérieurs en présence de vers (+ 58%) sauf durant les 9 premiers jours d'incubation où les volumes percolés sont similaires et importants (24 mL) (Tableau V.1). Dans les deux cas, les quantités d'eau lixiviées diminuent progressivement au cours de l'incubation et deviennent nulles à partir de 46 jours sur les colonnes de sol sans vers. Ceci correspond à la réduction des apports en eau (10mL *versus* 25mL)

Tableau V.1 volumes lixiviés au travers des colonnes incubées au laboratoire pendant 86 jours

Temps d'incubation	Volumes lixiviés (ml)		n
	Vers ⁻ moyenne (±SE)	Vers ⁺ moyenne (±SE)	
9j-	23,6 ±0,6 (a)	24,1 ±1,0 (a)	11 / 12
19j-	14,1 ±0,9 (a)	20,9 ±1,8 (b)	11 / 10
33j-	14,6 ±0,6 (a)	22,1 ±1,3 (b)	11 / 10
46j-	5,1 ±0,3 (a)	8,6 ±0,7 (b)	5 / 5
66j-	0 (a)	7,5 ±1,4 (b)	6 / 6
86j-	0 (a)	6,6 ±0,4 (b)	6 / 6
Totaux cumulés	50,1 ±5,0	70,5 ±5,7	

Des lettres identiques au sein de la même ligne indiquent que la différence n'est pas significative selon Mann-Whitney U-Test (p = 0,05).

Au terrain, en mésocosmes, les volumes lixiviés sont légèrement supérieurs en présence de vers (figure V.9) mais les différences ne sont pas significatives (Mann-Whitney U-test, 95%, n = 6, p = 0,2298). Durant la période juillet à septembre de faibles volumes sont collectés à 40 cm de profondeur (de 2 à 73 mL par mois, en moyenne). Au mois d'octobre avec le retour des pluies d'automne, les volumes lixiviés sont supérieurs (917 et 833 mL en présence et en absence de vers respectivement).

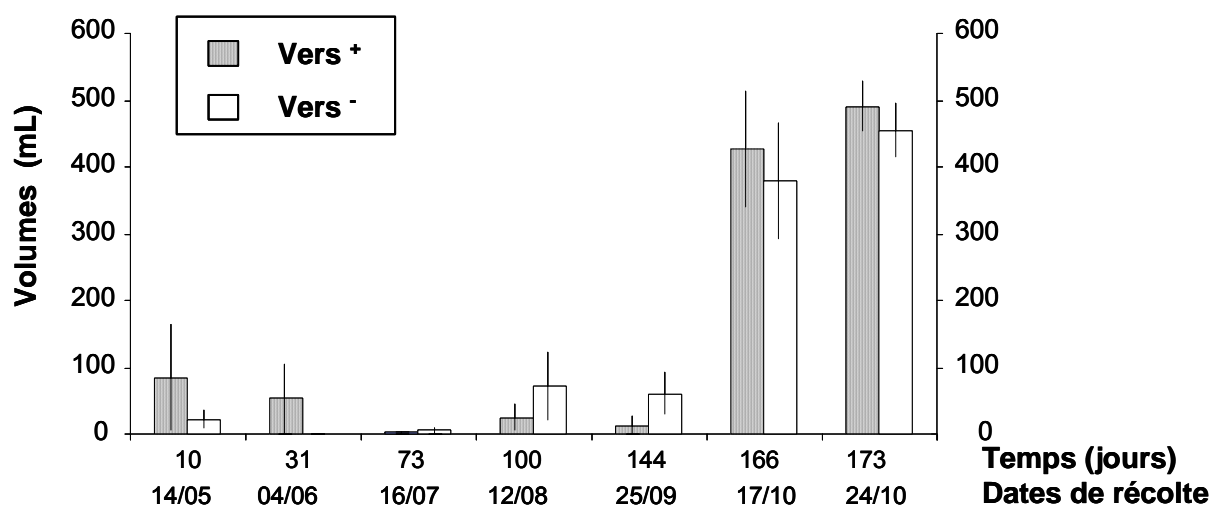


Figure V.9 Volumes lixiviés au travers des mésocosmes, au terrain, en fonction des dates de récoltes, au cours des 174 jours.

V.3.1.b Quantité de radioactivité lixiviée

En microcosmes, au laboratoire les quantités lixiviées sont supérieures en présence de vers. En raison de la variabilité importante au sein de la modalité vers, aucune différence significative n'est observée (tableau V.2).

Tableau V.2 Quantités de radioactivité lixiviée au travers des colonnes incubées au laboratoire pendant 86 jours.

Temps d'incubation	Quantité de radioactivité (Bq)		n
	Vers ⁻ moyenne (min-max)	Vers ⁺ moyenne (min-max)	
9j-	4,01 (0,00-16,15) (a)	32688,00 (0,67-163433,55) (a)	5 / 6
19j-	6,83 (4,36-8,12) (a)	776,16 (7,25-2697,04) (a)	5 / 4
33j-	20,02 (14,73-29,34) (a)	1940,81 (22,20-4772,11) (a)	5 / 4
46j-	1,93 (0,84-3,02) (a)	52,89 (3,38-102,41) (a)	2 / 2
66j-		436,12 (33,47-1180,12)	0 / 3
86j-		378,76 (23,61-1087,90)	0 / 3
Moyenne des totaux par microcosme	31,63 Bq / 0,003 %	29171 Bq / 3,02 %	

Des lettres identiques au sein de la même ligne indiquent que la différence n'est pas significative selon le test U, Mann-Whitney ($p = 0,05$).

Au terrain, l'impact des vers est visible dès le premier mois suivant l'application d'atrazine (figure V.10). Les quantités totales d'atrazine et de ses métabolites lixiviées sont supérieures en présence de vers aux deux premières récoltes : 14,1 et 5,8 KBq soit approximativement 25,3 et 10,5 μg d'atrazine et de ses métabolites. En absence de vers, la quantité de radioactivité dans

la première récolte de percolats est 17 et 7 fois inférieure (0,8 KBq soit 1,5 µg en équivalent atrazine et métabolites) (figure V.10).

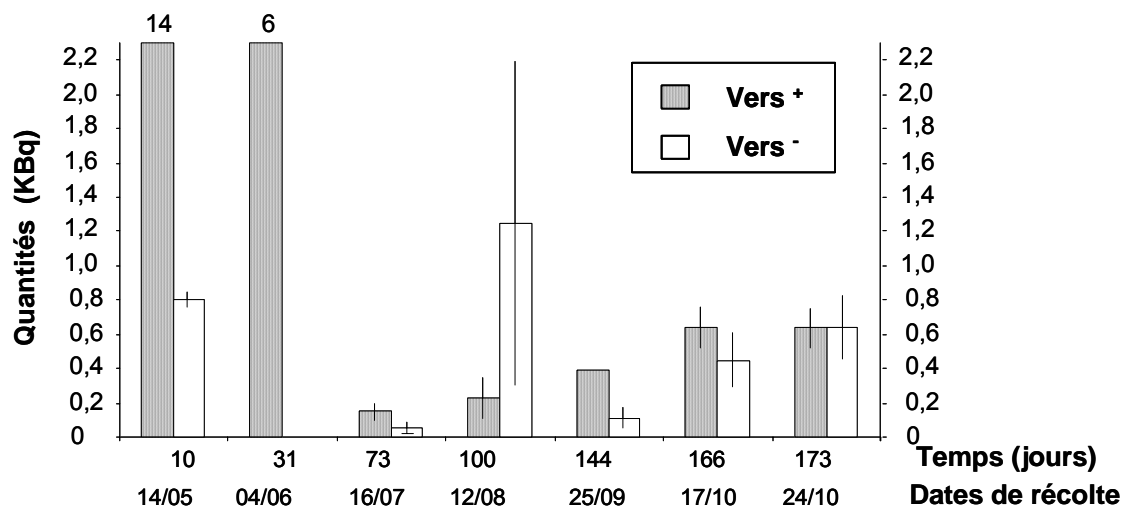


Figure V.10 Quantités de radioactivité lixiviées au travers des mésocosmes, au terrain, en fonction des dates de récoltes, au cours des 174 jours. Les barres indiquent les erreurs standards.

Pour toutes les dates de récolte suivantes, aucune différence significative n'est notée entre les modalités sans et avec vers (Mann-Whitney U-test, 95 %, 14/05 et 16/07 $n = 2/2$ $p = 0,2453$; 12/08 $n = 4/4$ $p = 0,4705$; 17/10 $n = 5/5$ $p = 0,4034$; 24/10 $n = 6/6$ $p = 0,6889$). Pour la récolte du 12/08, la quantité retrouvée est au moins 5 fois supérieure dans les percolats des mésocosmes sans vers par rapport à ceux des mésocosmes avec vers (1,2 vs 0,2 KBq). Toutefois à cette date, les échantillons présentent une grande variabilité (0,03 à 4,04 KBq soit 0,07 à 7,28 µg d'équivalent atrazine et métabolites).

V.3.2 Concentrations lixiviées d'atrazine et de ses métabolites

En colonnes, au laboratoire des quantités supérieures percolent en présence de vers mais les concentrations lixiviées sont très variables entre répétitions avec vers et ne présentent ainsi pas de différence significative (tableau V.3) avec les concentrations pourtant inférieures des répétitions de colonnes sans vers.

Tableau V.3 Concentrations de radioactivité lixiviées en colonnes au cours des 86 jours d'incubation

Temps d'incubation	Concentration de radioactivité (Bq/ml)			n
	Vers ⁻ moyenne (min-max)	Vers ⁺ moyenne (min-max)		
10j (14/05)	0,19 (0,00-0,77) (a)	1297,27 (0,03-7782,55) (a)		5 / 6
31j (04/06)	0,50 (0,27-0,68) (a)	51,63 (0,44-186,01) (a)		5 / 4
73j (16/07)	1,37 (0,93-1,84) (a)	70,39 (1,09-238,64) (a)		5 / 4
100j (12/08)	0,50 (0,33-0,67) (a)	7,18 (0,54-13,82) (a)		2 / 2
144j (25/09)		84,91 (2,57-236,20)		0 / 3
166j (17/10)		54,32 (3,27-155,59)		0 / 3

Des lettres identiques au sein de la même ligne indiquent que la différence n'est pas significative selon Mann-Whitney U-Test ($p = 0,05$).

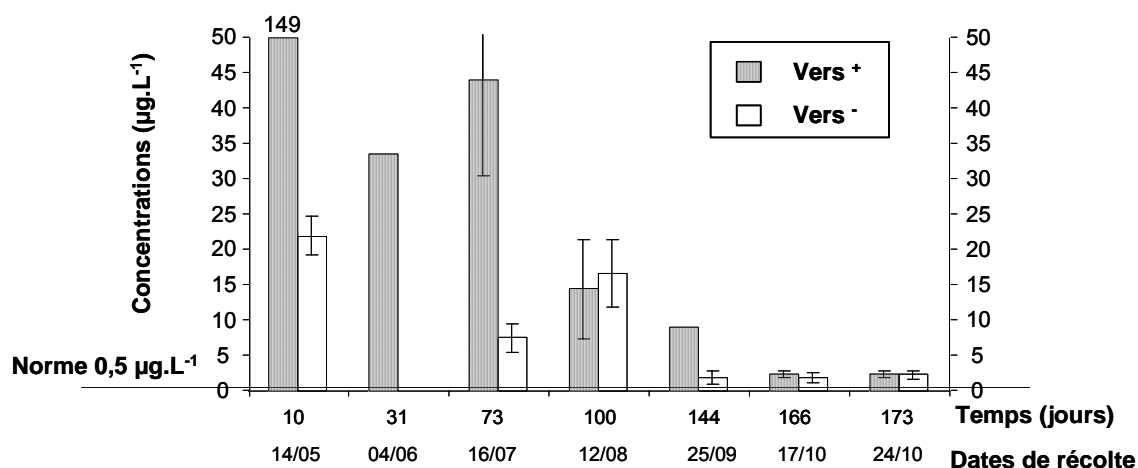


Figure V.11 Quantités de radioactivité lixiviées au travers des mésocosmes, au terrain, en fonction des dates de récoltes, au cours des 174 jours. Les barres indiquent les erreurs standards.

Les concentrations collectées à 40 cm de profondeur en sortie de mésocosmes, sont présentées en $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur la figure V.11 ce qui correspond à une approximation des concentrations d'atrazine et de ses métabolites de dégradation calculées à partir de la radioactivité détectée et avec la masse moléculaire de l'atrazine.

Les concentrations sont très élevées sur les trois premières dates et relativement élevées en août et septembre. Quelle que soit la date et la modalité, les concentrations retrouvées à 40 cm de profondeur sont supérieures aux normes de potabilités indiquées par le trait (figure V.11) ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'ensemble des substances détectées). Les concentrations des modalités avec et sans vers ne sont pas significativement différentes, quelque soit la date de récolte (Mann-Whitney U-test, 95 %, 14/05 et 16/07 $n = 2/2$ $p = 0,2453$; 12/08 $n = 4/4$ $p = 0,8852$; 17/10

$n = 5/5$ $p = 0,8345$; $24/10$ $n = 6/6$ $p = 0,6889$). Cependant les concentrations sont supérieures en présence de vers surtout aux 3 premières dates de récolte.

V.3.3 Métabolites de dégradation et action des lombriciens

Parmi les percolats récoltés au terrain et analysés (figure V.12), l'atrazine est le principal composé retrouvé (24 % avec vers et 32 % sans vers) suivi du DEA et DIA (respectivement 13 et 7 % avec vers et 13 et 16 % sans vers) et de l'hydroxyatrazine en présence de vers (2 %). Le profil des différents métabolites est semblable, excepté la présence, en faible quantité, d'hydroxyatrazine.

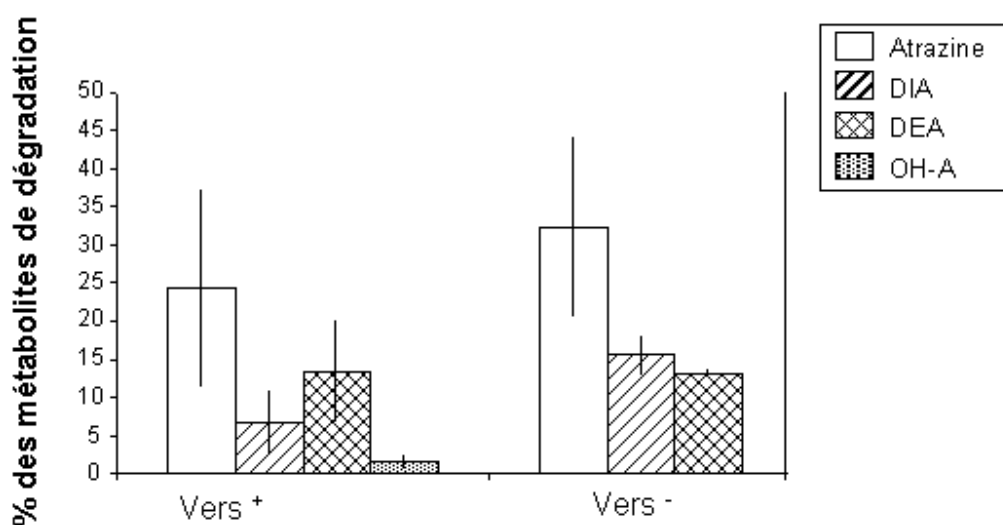


Figure V.12 Pourcentage des métabolites de dégradation de l'atrazine retrouvés dans les percolats. Les barres indiquent les erreurs standards.

V.3.4 Contamination potentielle (Exp. 4 au terrain, -40cm)

Les études au laboratoire en microcosmes montrent une grande variabilité des quantités percolées et à 15 cm de profondeur une contamination des eaux importantes. En effet 3 % de l'atrazine marquée au ^{14}C appliquée est retrouvée dans les percolats en présence de vers contre 0,003 % de la radioactivité initiale en absence de vers. Toutefois ces données sont critiquables en raison de l'effet bordure important des microcosmes.

L'expérimentation au terrain en mésocosmes permet de faire un point sur la contamination potentielle des eaux souterraines. En effet le nombre de mésocosmes où la contamination est

supérieure aux normes de potabilités est important. Seul un mésocosme (K3) en absence de vers, présente des quantités inférieures aux normes sur les trois dernières dates (tableau V.4).

Tableau V.4 Fréquence à chaque date, des percolats récoltés qui dépassent ou non le seuil de contamination des eaux par l'ensemble des pesticides.

Dates de récolte	> 0,5 µg.L ⁻¹		< 0,5 µg.L ⁻¹	
	Vers +	Vers -	Vers +	Vers -
14-05	2 / 6	2 / 6	0 / 6	0 / 6
04-06	1 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
16-07	2 / 6	2 / 6	0 / 6	0 / 6
12-08	4 / 6	4 / 6	0 / 6	0 / 6
25-09	1 / 6	2 / 6	0 / 6	1 / 6
17-10	5 / 6	4 / 6	0 / 6	1 / 6
24-10	6 / 6	5 / 6	0 / 6	1 / 6

En revanche les quantités totales percolées correspondent à 0,05 % et 0,14 % de l'atrazine appliquée respectivement en absence et en présence de vers, soit près de trois fois plus d'atrazine et de ses métabolites lixiviés en 174 jours.

RESUME : au terrain en mésocosmes et au laboratoire en microcosmes, la présence de vers dans le sol favorise les flux d'eau et d'atrazine en profondeur. En microcosmes les quantités de radioactivités lixiviées sont élevées et présentent une grande variabilité. Au terrain, la lixiviation est favorisée en présence de vers surtout après l'application de l'herbicide et dès les premières pluies. Les quantités lixiviées sont 3 fois supérieures en présence de vers (0,14 % vs 0,05 %) et les concentrations à - 40 cm dépassent la norme maximale de 0,5 µg/L.

V.4 Bilan de l'atrazine au sein des dispositifs d'échelles différentes

V.4.1 Au laboratoire, en microcosmes

La distribution de l'atrazine recouvrée au sein de chaque compartiment est représentée en figure V.13 en pourcentage de l'atrazine appliquée. Au terme de 43 jours d'incubation, les bilans d'atrazine ¹⁴C recouvrée dans les colonnes sans vers et avec vers sont respectivement de 61 et 57 %. La minéralisation de l'atrazine est supérieure en absence de vers après 43 jours (11 % *versus* 9 %) et 86 jours d'incubation (15 % *versus* 12 %).

En absence de vers l'essentiel de l'atrazine et de ses métabolites *i. e.* 50 % et 42 % à 43 et 86 jours respectivement sont retrouvés en haut de la colonne et respectivement 15 et 18 % de l'atrazine initiale y est sous forme liée. La lixiviation de l'atrazine y est négligeable (de l'ordre de 0,003% de la radioactivité initiale). En présence de vers, la majorité est également retrouvée sur les premiers centimètres de la colonne mais en quantité inférieure : 36 % à 43 jours et 23 % à 86 jours. La fraction liée représente ici respectivement 9 et 7 % de l'atrazine initiale. Le milieu de la colonne contient 5 et 8 % de l'atrazine appliquée, ce qui témoigne, par rapport à la colonne sans vers (1 et 3 %), d'une migration de l'herbicide en profondeur. La lixiviation de l'herbicide est également supérieure en présence de vers (3% en moyenne) mais très variable (de 0,03 à 18%).

Après 43 jours d'incubation, les compartiments de sol liés aux vers contiennent 6,3 %, 0,5% et 0,1% de l'atrazine initiale respectivement pour les turricules, les galeries et l'endètre. Les turricules contiennent 8 % de la radioactivité initiale après 86 jours d'incubation. Un transfert direct mais faible par voie biologique (adsorption sur l'épiderme) est également mis en évidence (0,015 et 0,042 % après 43 et 86 jours respectivement).

Les vers conduisent donc à une multiplication des voies de transfert de l'atrazine et de ses résidus dans le sol. Ainsi ils i) ralentissent la minéralisation de l'atrazine, ii) favorisent la migration de l'atrazine en profondeur et donc sa lixiviation, iii) conduisent à la création de microsites de sol particuliers, les turricules, où l'adsorption est 3 fois supérieure et la quantité résiduelle d'atrazine par gramme de sol est bien représentée.

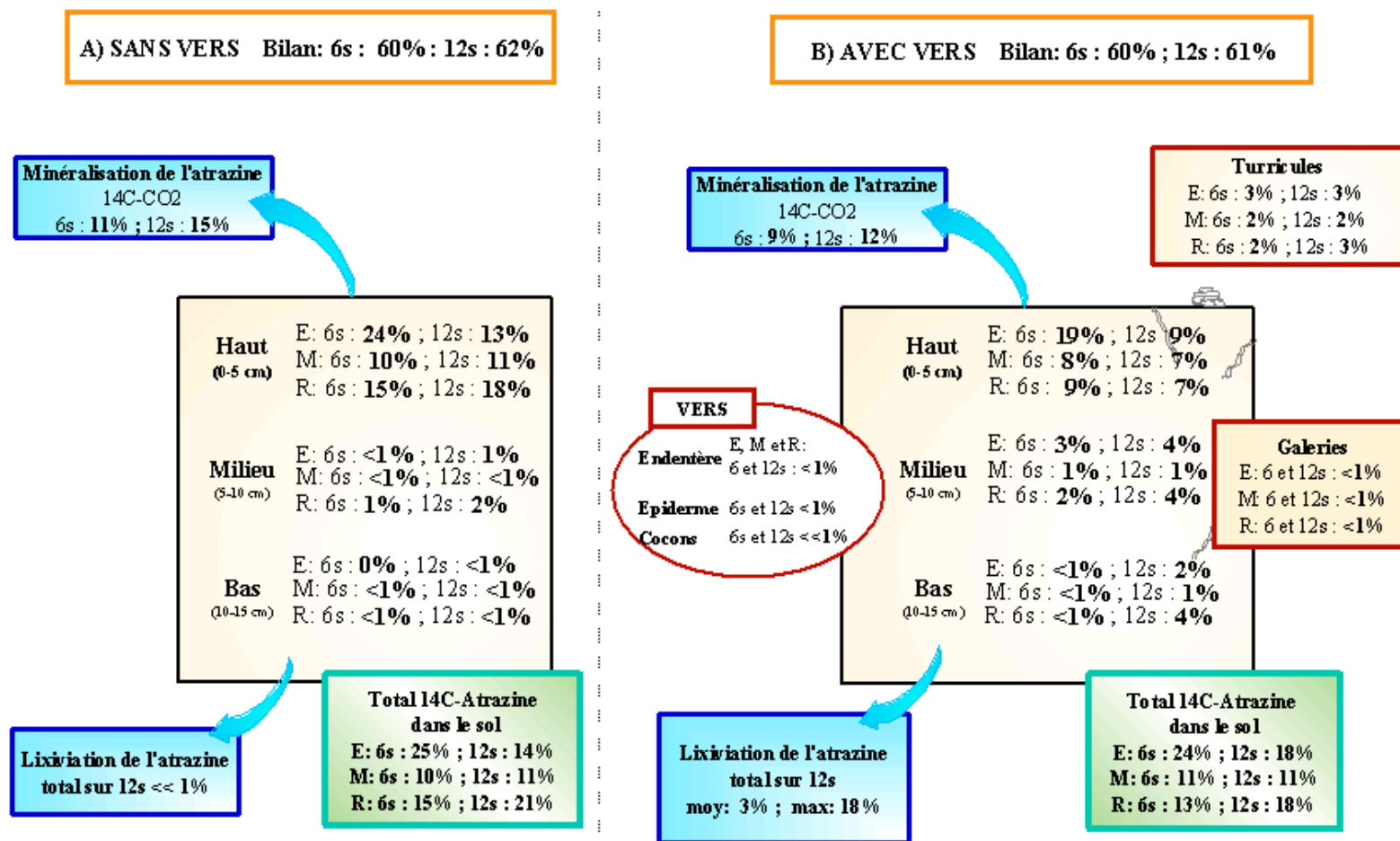


Figure V.13 Bilan des transferts de l'atrazine ¹⁴C après 43 et 86 jours en microcosme, au laboratoire, en présence (A) et en absence de vers (B). E, M et R sont respectivement les fractions extractibles à l'eau, au méthanol et les fractions non extractibles de la radioactivité mesurée

V.4.2 Au terrain, en mésocosmes

La distribution de l'atrazine recouvrée au sein de chaque compartiment est représentée à la figure V.14 en pourcentage de l'atrazine appliquée. La distribution de la radioactivité au terrain montre que la radioactivité au sein des compartiments liés au vers (turricules, galeries et déjections) entre 0 et 20 cm correspond au total à 0,6 % de l'atrazine ^{14}C appliquée. Les quantités d'atrazine et de ses métabolites sont supérieures dans les premiers centimètres de sol et supérieures en absence de vers (21,8 % vs 8,8 %). Les quantités retrouvées au niveaux 5-10 cm sont équivalentes au sein des deux modalités (3,4 vs 3,3 %) mais légèrement supérieures en absence de vers pour le niveau 10-20 cm (2,6 vs 1,7 %). Au terrain, les vers ne favorisent donc pas une diffusion de l'atrazine et de ses métabolites en profondeur dans le sol même si les quantités percolées sont quant à elles supérieures en présence de vers (0,05 vs 0,14 %). La fraction liée est la plus élevée (< 20 %) et le total de la radioactivité retrouvée sous forme extractible dans les compartiments liés au vers entre 0 et 20 cm correspond à 0,5 % de la radioactivité appliquée.

V.4.3 Bilan des expérimentations

Les bilans de l'expérimentation sont de 60 % au laboratoire et de 46 à 60 % au terrain en mésocosmes ce qui paraît faible mais qui est dû au volume important de sol utilisé et à la faible proportion de sol analysé par rapport au sol présent. En revanche la répétitivité des échantillons de sol permettent d'accréditer les données obtenues au terrain.

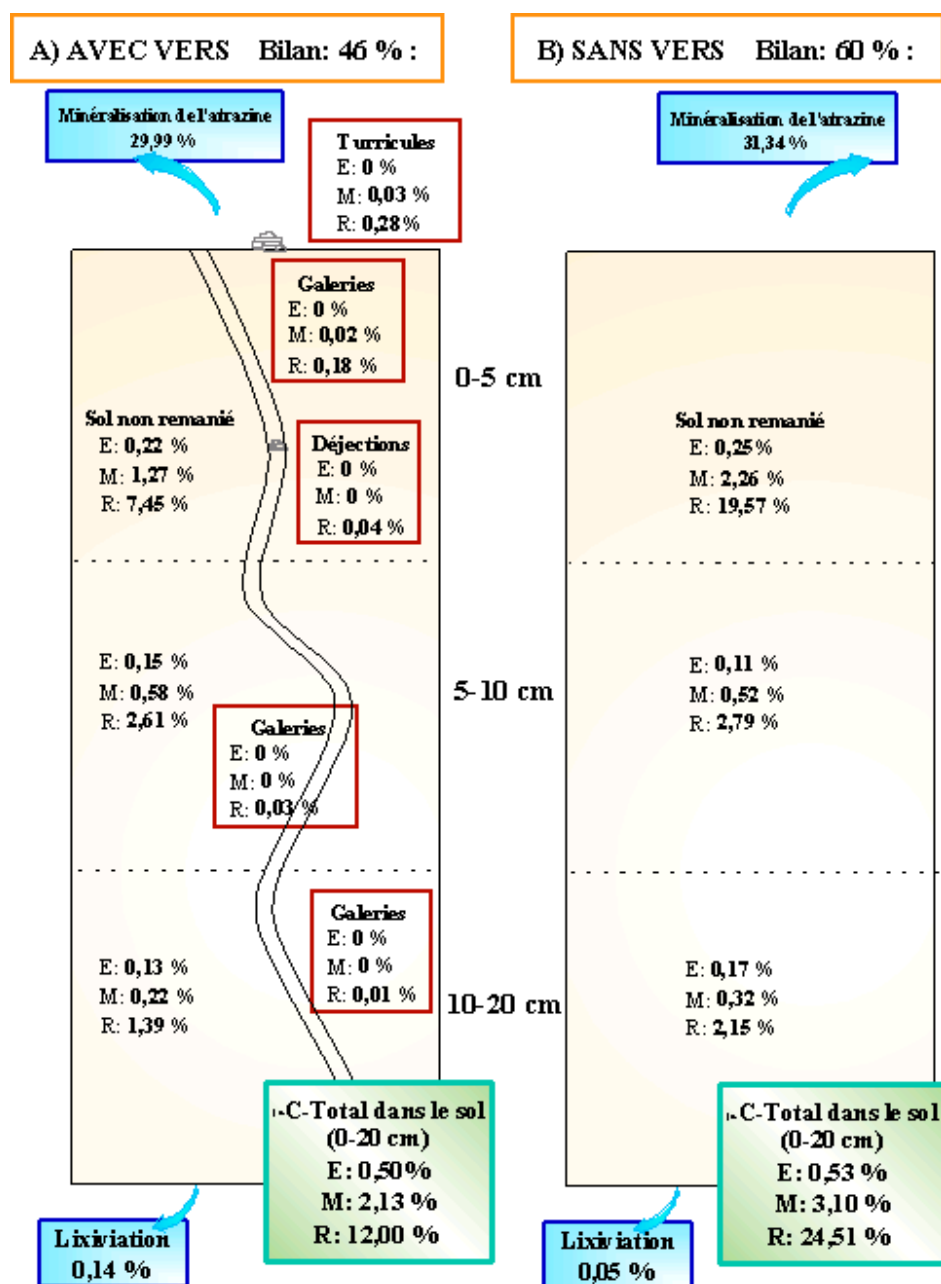


Figure V.14 Bilan des transferts de l'atrazine ^{14}C après 174 jours en mésocosmes, au terrain, en présence (A) et en absence de vers (B). E, M et R sont respectivement les fractions extractibles à l'eau, au méthanol et les fractions non extractibles de la radioactivité mesurée.

V.5 Discussion

V.5.1 Redistribution de l'atrazine à l'échelle des microsites

Les expérimentations menées au laboratoire en microcosmes et au terrain en mésocosmes, montrent que les lombriciens favorisent l'adsorption et la rétention de l'atrazine dans des microsites de sol qu'ils créent eux mêmes ; la biodisponibilité de l'atrazine en est d'autant réduite. Les lombriciens en déplaçant le sol (ingestion et creusement de galeries) redistribuent plus en profondeur et concentrent l'atrazine dans des microsites répartis de manière hétérogène dans le sol. La concentration de l'atrazine dans ces microsites de sol est corrélée à leur enrichissement en carbone organique (figure V.6).

L'atrazine et ses métabolites de dégradation sont concentrés dans les microsites créés par les vers *i. e.* le sol ingéré (les endentères), le sol excrété en surface (les turricules), le sol excrété au sein des galeries (les déjections) et le sol creusé (les parois de galeries) par rapport au sol non remanié du profil. L'enrichissement du sol en carbone organique se fait par ingestion de matière organique du sol et de litière, et au cours du transit intestinal par sécrétion de mucus (Lee 1985 ; Lavelle et Spain 2001). D'autre part l'adsorption de l'atrazine est dépendante des quantités de carbone (Khan 1978 ; Demon *et al.* 1994 ; Houot *et al.* 1998 ; Farenhorst et Bowman 2000). Ces deux processus s'additionnent et permettent la formation d'atrazine non extractible supplémentaires *i. e.* une biodisponibilité moindre de l'atrazine dans le sol.

V.5.2 Le microsite galerie

La rétention effective de l'atrazine dans les parois de galeries n'a jamais été démontrée auparavant. Les travaux dans la littérature sur la rétention sur des parois de galeries portent sur des quantifications indirectes ou encore directes mais *in vitro*, traduisant ainsi une rétention potentielle. Nous avons étudié la rétention effective d'atrazine directement dans des parois de galeries « naturelles » *i. e.* obtenues dans des conditions approchant au mieux les conditions naturelles. Pour rappel, les contraintes et précautions appliquées ont été les suivantes : i) dans les microcosmes au laboratoire : atrazine appliquée en surface du sol à la dose d'application recommandée au champ, sol compacté à la densité au champ, incubation à 12°C, deux espèces de lombriciens combinées, incubation à moyen et long terme 43 et 86 jours, et ii) dans les mésocosmes au terrain : atrazine appliquée en surface du sol à la dose d'application recommandée au champ, sol compacté à la densité au champ et d'une masse de 50 kg,

conditions de température, d'ensoleillement et de pluviométrie naturelles, deux espèces de lombriciens combinées, expérimentation à long terme 174 jours.

Ainsi, la rétention supérieure potentielle de l'atrazine dans les parois de galeries de *L. terrestris* a été rapportée i) *in vitro* avec du sol collecté sur les galeries de *L. terrestris* (Stehouwer *et al.* 1993) ii) par mesures indirectes de la rétention en comparant des galeries de *L. terrestris* et des galeries artificielles dans des monolithes de sol et *in situ* (Stehouwer *et al.* 1994 ; Edwards *et al.* 1992). Une solution d'herbicide est versée à l'entrée des galeries et la différence de concentration entre la solution appliquée et celle percolée constitue la mesure de rétention de l'atrazine. Des quantités supérieures d'atrazine ont été ensuite mesurées sur les parois des galeries (Stehouwer *et al.*, 1994). Dans ce cas d'étude, l'atrazine a été versée sur des galeries déjà mises en place depuis longtemps et abandonnées. L'étude ne tient donc pas compte du comportement du ver ni de son influence possible sur l'adsorption de l'atrazine. D'autre part, le mode d'application de l'herbicide peut également intervenir puisque la solution d'atrazine a été versée directement à l'entrée des galeries (50 mL). Les résultats obtenus par Edwards *et al.* (1992) et Stehouwer *et al.* (1994) traduisent plutôt une différence d'écoulement au travers du sol qu'une réelle mesure de la rétention de l'atrazine.

Dans nos expérimentations, les galeries existaient au plus, depuis 48^h et les autres ont été mises en place au cours des 86 jours d'incubation. D'autre part, l'atrazine a été appliquée sur toute la surface du sol, sa redistribution et sa rétention sont donc soumises aux actions du ver, de manière directe.

Nous avons ainsi pu souligner l'importance de l'action des vers dans la redistribution verticale de l'atrazine dans les différents horizons de sol. Au laboratoire, en microcosmes les galeries prélevées sur toute la hauteur de la colonne de sol (15 cm) présentent des concentrations équivalentes au sol de surface (0-5 cm) mais supérieures aux concentrations des horizons plus profonds (5-10 cm et 10-15 cm). En mésocosmes, au terrain, les gros volumes de sol manipulés nous ont permis d'échantillonner les parois de galeries à chaque profondeur. Pour chaque niveau de profondeur, la concentration en atrazine est significativement supérieure dans les galeries par rapport au sol non remanié correspondant (au moins 1,5 fois à 0-5 cm ; 4 fois à 5-10 cm ; 11 fois à 10-20 cm). *In vitro*, à partir de parois de galeries collectées au champ et analysées en solution, Stehouwer *et al.* (1993) ont montré que l'adsorption potentielle sur le sol des parois de galeries par rapport au sol environnant était trois fois supérieure aux profondeurs 0-20 cm, et équivalente à 20-40 cm. Farenhorst *et al.* (2000a) ont montré que la présence de vers dans les galeries établies depuis 4 mois, favorisait la distribution d'atrazine en profondeur sur les parois des galeries par rapport au sol environnant. Cependant, parmi le sol prélevé dans les galeries, les auteurs n'ont pas pu différencier l'effet des déjections (« turricules » excrétés dans les galeries) de l'effet des galeries elles-mêmes. A la différence de Farenhorst *et al.*

(2000a), nous avons montré que pour les horizons de sol inférieurs à 0-5 cm, la rétention de l'atrazine dans les galeries ne diminue pas avec la profondeur contrairement au sol non remanié. Les effets du comportement fouisseur et des allées et venues répétées des lombriciens, favorisent directement et significativement le transport et l'adsorption de l'atrazine en profondeur sur les parois de galeries. Les quantités adsorbées sur leur épiderme sont en effet cinq fois supérieures avec le temps, pour l'espèce *L. terrestris*. Les galeries constituent une voie de redistribution de l'atrazine le long du profil de sol.

V.5.3 *Le microsite turricule*

La concentration d'atrazine dans les turricules a été mesurée potentiellement *in vitro* pour l'espèce anécique *L. terrestris* (Akhouri *et al.* 1997 ; Farenhorst et Bowman, 2000) et suggérées par des expérimentations de lixiviation avec des turricules de l'espèce épigée *L. rubellus* et de l'espèce endogée *A. caliginosa* (Bolan et Baskaran, 1996).

L'accélération effective de la formation de résidus non extractibles a été mesurée dans du sol bioturbé par l'anécique *L. terrestris* (30,3% de l'atrazine initiale contre 9,3%) (Farenhorst *et al.* 2000a) mais les auteurs n'ont pas pu différencier l'effet du sol excrété en tant que turricules et en tant que galeries.

Nous avons pu préciser cette rétention en différenciant les microsites créés par les vers de terre. Nous montrons ainsi que l'atrazine est davantage concentrée dans les endentères et les turricules, et qu'elle est deux fois plus concentrée dans les turricules que dans les parois de galeries. Pour les déjections, les concentrations sont intermédiaires à celles des turricules et des parois de galeries sans être significativement supérieures à ces dernières.

Dans l'expérimentation de Farenhorst *et al.* (2000a) les vers se nourrissaient de litière de maïs déposée en surface de colonne et sur laquelle l'atrazine avait été appliquée. En revanche dans notre étude, l'apport d'atrazine est réalisé sur le sol. La litière est apportée dans un deuxième temps. Cette différence méthodologique permet de préciser que les concentrations d'atrazine dans le sol des turricules sont supérieures parce que l'herbicide est i) recruté par le ver lors de l'ingestion de sol et ii) qu'il y est davantage adsorbé.

Puisque l'atrazine est davantage concentrée dans les endentères et les turricules que dans les parois de galeries, l'alimentation sélective et l'ingestion du sol par les vers sont davantage déterminants que le déplacement du sol dans le processus de rétention. Une différence entre les deux microsites réside dans la quantité et la qualité de la matière organique. En fait les parois de galeries accumulent plus ou moins de fragments de litière décomposée que les anéciques enfouissent en profondeur et, du mucus et du matériel fécal déposés lors des nombreux passages du vers (Bouché, 1977 ; Lee, 1985 ; Jégou 1998). Dans les turricules, le

mélange intime entre le sol et la litière dans le tube digestif du ver est un processus plus compliqué. Du mucus et de l'eau sont ajoutés au cours du transit (Barois et Lavelle, 1986) et une proportion de la matière organique ingérée est fragmentée (Lee, 1985 ; Lavelle et Spain, 2001).

Des analyses complémentaires de la composition des turricules confirment l'implication de particules fines de sol des turricules ($< 2 \mu\text{m}$) dans la rétention de l'atrazine. Cependant dans les turricules, ce n'est pas tant l'argile recrutée par le ver que la matière organique contenue dans la fraction grossière qui détermine l'adsorption (Binet *et al.*, données non publiées, annexe 7). Les changements chimiques se produisant lors de l'humification de la matière organique ne seraient pas les seuls processus pour la stabilisation des résidus de l'atrazine sous forme non extractible. En fait les concentrations de résidus liés de l'atrazine dans les fractions $> 200 \mu\text{m}$ et $200\text{-}50 \mu\text{m}$ sont supérieures à celles dans la matière organique humifiée isolée dans les fractions plus fines ($< 50 \mu\text{m}$) (Barriuso *et al.*, 1991 ; Barriuso et Koskinen, 1996). Ces observations remettent en question l'idée reçue de l'implication des argiles et du complexe argilohumique dans l'adsorption de l'atrazine. L'association des composés plus humifiés avec les minéraux dans la fraction $< 50 \mu\text{m}$ diminuerait l'accessibilité pour des réactions de liaisons avec l'atrazine (Barriuso et Koskinen, 1996).

Sur un sol limoneux amendé avec de la chaume en décomposition et incubé pendant trois mois, la formation de résidus liés de l'atrazine est accrue sur les fractions $> 200 \mu\text{m}$ et $200\text{-}50 \mu\text{m}$. Des changements chimiques et la présence de microorganismes associée à la décomposition du matériel végétal sont impliqués dans cette accumulation de résidus liés de l'atrazine (Benoit et Preston, 2000). D'après nos expérimentations, les résultats sommaires acquis sur la répartition des résidus liés de l'atrazine dans les fractions de la matière organique du sol contenues dans le sol non remanié et les turricules vont dans le sens des observations des auteurs précités. La majeure partie des résidus sont liés à la fraction la moins humifiée de la matière organique (acides fulviques). La fragmentation de la matière organique et les microorganismes ingérés par les vers libérerait ainsi des sites réactifs sur lesquels l'atrazine s'adsorberait plus facilement par rapport à des sites totalement humidifiés.

De l'hypothèse nouvelle émise ci dessus, il ressort que le rôle des lombriciens dans la rétention de l'atrazine va dépendre largement de l'espèce et de son mode d'alimentation. Nous montrons que le sol excrété au sein des galeries de lombriciens, (déjections) contient des concentrations d'atrazine totales et d'atrazine non extractibles proches de celles des galeries et inférieures à celles des turricules. Dans nos expérimentations, les déjections collectées proviennent en majeure partie de l'espèce endogée *A. caliginosa* et les turricules surtout de l'espèce épi-anécique *L. terrestris*. *A. caliginosa* est un ver géophage ingérant beaucoup de sol ; il se nourrit de particules minérales fines et de matière organique contenue dans la matrice du sol. Les fragments ingérés par certaines espèces endogées ne dépassent pas le diamètre de leur

bouche contrairement à d'autres qui se nourrissent sur des agrégats larges et les séparent en agrégats de plus petite taille (Blanchart, 1990 ; Derouard, 1993). *L. terrestris* est un épianécique, fouisseur de litière. Son bol alimentaire est très riche en matière organique et contient beaucoup de fragments de litière (MO figurée) (Bouché, 1977 ; Judas, 1992). Les vers anéciques agissent principalement sur le devenir de la matière organique morte non humifiée (fragmentation) (Judas, 1992, figure V.15). La matière organique particulaire (MOP) dans les fractions $> 50 \mu\text{m}$ représente respectivement 60 % et 30 % du carbone total des turricules et des parois de galeries de *L. terrestris*, (en microcosmes avec apport de ray-grass). Elle est principalement localisée dans la fraction 200-2000 μm (Ablain, 2002). Si il est vérifié que l'atrazine présente une réactivité plus forte pour la matière organique contenue dans la fraction grossière (litière fraîche encore figurée) que pour la matière organique contenue dans la fraction fine du sol (MO en cours d'humification), on peut supposer une implication accrue des vers anéciques dans la rétention de l'atrazine puisqu'ils ingèrent proportionnellement plus de matière organique grossière que les endogés.

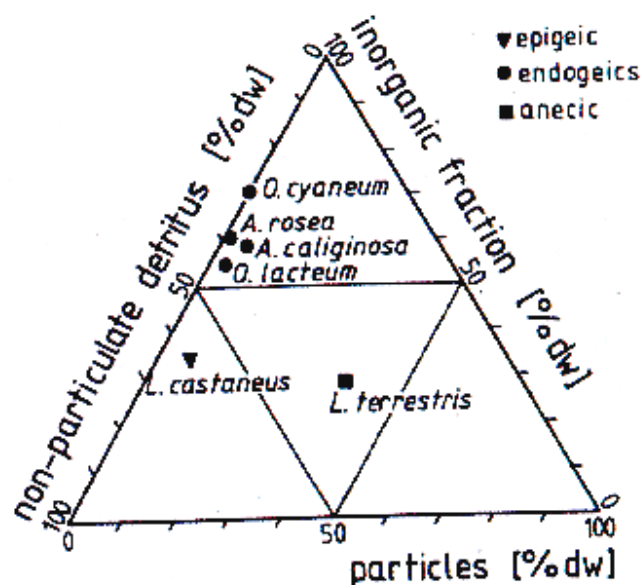


Figure V.15. Composition du contenu stomacal de six espèces de ver de terre, en pourcentage de particules minérales (inorganic fraction), de matières organiques figurés ($> 50 \mu\text{m}$) (particles), de matières organiques non figurés ($< 50 \mu\text{m}$) (non-particulate detritus).

V.5.4 Disponibilité de l'atrazine

En microcosmes, la majeure partie de l'atrazine retenue dans le sol est retrouvée sous forme mobilisable ou disponible *i. e.* l'atrazine en solution dans le sol et utilisable par les organismes (plantes, micro-organismes). La spéciation chimique en fonction de la disponibilité de l'atrazine (extractible à l'eau : 60-70 % / extractible au méthanol : 10 % / non-extractible : 30-20 %) observée en microcosmes est liée à la nature et au taux de matière organique du sol initial. Elle est susceptible d'évoluer avec le temps vers une plus grande quantité de résidus liés avec le temps. En effet dans un sol brun 90% des résidus de l'atrazine sont liés au bout de 63 jours (Hayar *et al.*, 1996). Quel que soit le microsite et l'enrichissement en carbone organique les résidus non extractibles s'accroissent de 10 à 20 % de 43 à 86 jours. Au terrain après 174 jours, l'atrazine non extractible est 100 fois supérieure à l'atrazine extractible à l'eau et 10 fois supérieure à l'atrazine extractible au méthanol (3 % / 12 % / 85 %). L'augmentation des résidus non extractibles de l'atrazine avec le temps de résidence (de 1 à 90 jours) a été observée en situation de non-labour et de labour conventionnel par Radosevitch *et al.* (1997). L'augmentation de la fraction non extractible de l'atrazine en sol non labouré était expliquée en partie par une adsorption supérieure liée aux plus fortes teneurs en matière organique dans le sol non-labouré. D'autre part, l'augmentation au cours du temps de la fraction non extractible d'atrazine dans les deux types de sol est expliquée par la diffusion progressive d'atrazine soluble dans les micropores. (Radosevitch *et al.*, 1997). Nos résultats obtenus avec les endentères suggèrent un rôle important de l'eau dans la rétention de l'atrazine en parallèle avec le mélange des éléments ingérés au cours du transit. La teneur en eau dans l'endentère et donc dans les turricules fraîchement déposés est supérieure (Barois et Lavelle, 1986). La microporosité est plus élevée dans les galeries (Binet et Curmi, 1997) et dans les turricules (Shipitalo et Protz, 1989). La microporosité en lien avec les teneurs accrues en eau dans les galeries et les turricules pourrait conduire à la diffusion progressive puis à la séquestration d'atrazine dans les biostructures et favoriser ainsi sa rétention. Cette part d'atrazine, soluble et disponible mais séquestrée au cours du temps, serait ainsi soustraite à la biodégradation par la microflore (Radosevitch *et al.*, 1997).

Après excrétion les turricules sont déposés en surface et leur stabilité augmente avec les cycles de réhumectations-séchages lors des événements pluvieux (Marinissen et Dexter, 1990 ; Hindell *et al.*, 1997). De plus avec le temps, la prolifération d'hyphes de champignons sur la surface des turricules peut également favoriser leur stabilisation (Parle, 1963b ; Marinissen et Dexter, 1990 ; Hindell *et al.*, 1997). Les turricules où les quantités de résidus non extractibles sont supérieures représentent d'autant plus des microsites où l'accessibilité de l'atrazine pour la minéralisation par les microorganismes serait atténuée avec le temps.

Pour appréhender les mécanismes fins conduisant à une rétention supérieure de l'atrazine dans le sol ingéré, il conviendrait d'analyser en complément i) les changements de microporosité du sol au cours de son passage dans le tube digestif des vers (formation des turricules) ii) les changements structuraux intervenant lors du vieillissement des turricules.

La répartition de l'atrazine entre les trois fractions d'extractions suit sensiblement les mêmes proportions entre les différents microsites de sol pour une même date. Aussi, en concentrant plus d'atrazine par gramme de sol, les turricules, les déjections et les galeries contiennent plus de résidus liés. Pour les turricules, les quantités disponibles et potentiellement disponibles de l'atrazine diminuent progressivement du 14^e au 86^e jours.. Pour les autres microsites de sol (galeries et sol non remanié aux différents horizons), les quantités de résidus liés augmentent de 43 à 86 jours. Les turricules ayant tous le même âge (une semaine cf. matériel et méthode), les vers semblent donc ingérer moins de sol contaminé en fin d'incubation qu'en début. Les quantités de résidus liés dépendent de la concentration d'atrazine présente dans le sol au moment de l'ingestion et de l'activité d'ingestion. Le recrutement actif de l'atrazine par les vers détermine donc les quantités de résidus liés dans les turricules.

Les lombriciens influencent également la formation et la rétention de métabolites de dégradation dans la fraction extractible au méthanol. Les composés hydroxylés y sont majoritaires dans le sol ingéré ou remanié par le ver en comparaison avec le sol non remanié du premier horizon.

L'hydroxylation était connue pour être catalysée chimiquement (Skipper *et al.*, 1967), la réaction se produisant en conditions acides et impliquant les fonctions acides des substances humiques (Khan, 1978). Récemment des travaux ont montré qu'elle était d'origine microbienne (Mandelbaum *et al.*, 1993b ; De Souza *et al.*, 1995). Aux vues de nos résultats sur la minéralisation de l'atrazine (chapitre IV), il semble que la formation d'hydroxyatrazine soit liée aux conditions abiotiques dans les microsites créés par les vers. Le pH des turricules est plus proche de la neutralité que le sol dont ils dérivent. Cette augmentation de pH en sols acides serait due à l'excrétion d'ammonium dans l'intestin ou à la production de carbonate de calcium dans les glandes calcifères et son relargage dans l'intestin (Lee, 1985). Le pH des biostructures de nos expérimentations serait donc moins acide que celui du sol initial (6,4) et ces valeurs attendues ne permettent pas d'expliquer la formation d'hydroxyatrazine.

La mobilité de l'hydroxyatrazine est moindre que celle de l'atrazine et des autres métabolites (Schiavon, 1988). La rétention de résidus de l'atrazine dans les biostructures pourrait donc être favorisée par la formation supplémentaire d'hydroxyatrazine.

L'analyse en lien de i) de l'évolution du pH dans les biostructures et ii) de la formation des métabolites dans le temps serait nécessaire pour déterminer l'impact réel du pH sur la formation et la par la suite la rétention des métabolites de l'atrazine dans les biostructures.

V.5.5 Mobilité et lixiviation de l'atrazine

Nous avons démontré au laboratoire comme au terrain que les lombriciens sont responsables d'une redistribution verticale de l'atrazine et de ses métabolites. En absence de vers, l'atrazine appliquée en surface est retrouvée majoritairement dans les premiers centimètres du sol. Ceci est cohérent avec ses caractéristiques physico-chimiques connues, en particulier avec une faible mobilité ($K_{oc}124$).

En présence de vers, moins d'atrazine est séquestrée dans l'horizon de surface et davantage d'atrazine migre en profondeur. La litière en partie enfouie manuellement dans le sol en absence de vers a probablement joué un rôle de barrière vis-à-vis de la percolation de l'eau et de la molécule. Les lombriciens sont donc responsables d'une soustraction de l'atrazine et des métabolites dans les premiers centimètres de sol.

Le sol environnant n'est pas remanié par les vers de terre. Il s'agit donc là, d'une action indirecte des lombriciens liée à leur comportement. En déposant des turricules et en enfouissant la litière ces derniers créent probablement une différence dans l'infiltration sur le niveau supérieur (0-5 cm). La formation des galeries par compression des particules chez *Nicodrilus giardi* augmente la surface de contact entre les agrégats et assure une meilleure continuité qui favorise la diffusion de l'eau (Guerif, 1990). *L. terrestris* et *A. caliginosa* forment leurs galeries par ingestion de sol et tassement des déjections déposées. Ce tassement favorise la formation de cutanes où la porosité est réduite (Jégou, 1998). La continuité est potentiellement favorisée au niveau des parois de galeries. Carter (2000) distingue le "through-flow", un mouvement latéral de l'eau sous la surface du sol, comme une voie de transport des herbicides dans le sol, même si cette voie n'est pas considérée comme une voie de contamination majeure. Un transport latéral à partir des galeries pourrait participer à la diffusion d'atrazine vers le sol non remanié et donc à sa concentration supérieure en profondeur (5-10 cm et 10-15 cm, en microcosmes). Au terrain en mésocosmes, en présence et en absence de vers, les concentrations d'atrazine dans le sol non remanié sont équivalentes en profondeur (5-10 et 10-20 cm). Avec l'augmentation de l'échelle des dispositifs, certains processus liés aux activités lombriciennes sont masqués.

Nous avons démontré que les lombriciens influencent la lixiviation de l'atrazine et de ses métabolites. Il est reconnu que les galeries constituent une voie d'écoulement préférentiel (Joschko *et al.*, 1989). Des mesures de flux d'atrazine ont été effectuées par différence de concentration entre la solution appliquée et celle percolée au travers des galeries de *L. terrestris* en comparaison à des galeries artificielles, dans des monolithes de sol et *in situ* (Edwards *et al.* 1992 ; Stehouwer *et al.* 1994). Les concentrations d'herbicide percolées étaient 34 % et 75 %

moindres après passage au travers des vraies galeries. Cependant la solution d'herbicide était versée directement à l'entrée des galeries. Ces études ne prennent donc pas en compte l'influence des lombriciens ni de leur biostructures par rapport à un sol non remanié. En revanche la lixiviation supérieure de l'atrazine avec l'augmentation du nombre de lombriciens introduits dans des colonnes de sol prélevées au terrain et soumises à des pluies artificielles a été démontrée par Sigua *et al.* (1995). Dans notre expérimentation, en microcosmes, non soumis à des pluies artificielles, mais à des apports d'eau à intervalles réguliers, les volumes d'eau lixiviés sont significativement supérieurs en présence de vers. Cependant les quantités d'atrazine lixiviées en présence de vers présentent une grande variabilité (de 0,03 % à 18 %) et sont en moyenne faibles (3 %) par rapport à la quantité d'herbicide appliquée.

Cependant l'activité fouisseuse des lombriciens ainsi que l'occupation des galeries par les vers peut réduire la lixiviation potentielle de l'herbicide au travers des galeries. En effet un transport préférentiel de l'atrazine via les galeries de *L. terrestris* a été observé sous pluies artificielles en colonnes par Farenhorst *et al.* (2000b). Les quantités d'atrazine détectées dans les percolats étaient deux fois plus faibles en présence de vers. L'obstruction des galeries par les fragments de litière enfouis ainsi que la présence du ver dans la galerie expliquent cette différence de lixiviation. (Farenhorst *et al.* 2000b). Le matériel ingéré est transporté depuis la surface jusqu'en profondeur augmentant ainsi la quantité de résidus non extractibles. Dans nos expérimentations en microcosmes au laboratoire, l'atrazine est appliquée à la surface du sol, avant l'apport de litière et sans turricules en surface. La lixiviation a pu être favorisée par rapport à l'étude de Farenhorst où l'herbicide est épandu sur la litière. Appréhender l'influence des lombriciens sur la lixiviation de l'herbicide dans sa globalité impliquerait de connaître la part de ces deux processus par un marquage différent de l'herbicide apporté sur la litière d'une part, et sur le sol d'autre part.

Au terrain, nous montrons un lessivage supérieur de l'atrazine en présence de vers, avec l'arrivée des premières pluies. Les flux percolés s'atténuent par la suite mais sont au final trois fois supérieurs en quantités totales, en présence de vers après 174 jours (0,14 % vs 0,05 % de l'atrazine appliquée, en présence et en absence de vers respectivement). S'agissant de la mobilité des métabolites de l'atrazine, Farenhorst *et al.* (2000b) n'ont pas observé de différence entre les eaux drainées dans les colonnes avec et sans vers. Nos résultats au terrain, indiquent une lixiviation principalement de l'atrazine par rapport à ses métabolites. L'hydroxyatrazine a été uniquement détectée dans les eaux de percolation issues des mésocosmes bioturbés par les vers alors qu'inversement aucune trace d'hydroxyatrazine n'a été décelée dans les eaux de percolation des mésocosmes contrôles (sans vers). Mais ces observations ne permettent pas de conclure à une lixiviation préférentielle d'un métabolite de l'atrazine par les galeries.

CHAPITRE VI CONCLUSION

En amont de cette étude, deux questions alternatives étaient posées concernant les relations entre les activités lombriciennes et les dynamiques physiques et chimiques d'un herbicide modèle, l'atrazine, dans le sol. La première concernait la participation des lombriciens à l'atténuation naturelle des polluants organiques dans les sols. Il s'agissait en particulier de savoir si les lombriciens contribuent à la minéralisation partielle ou totale de l'atrazine en stimulant l'activité de la microflore dégradante du sol. La seconde question alternative s'orientait sur l'implication des lombriciens dans la rétention et la rémanence de l'herbicide dans le sol. Il s'agissait là de mesurer la portée de la bioturbation du sol par les lombriciens sur la redistribution et la disponibilité de l'herbicide dans le sol.

Pour répondre à ces interrogations nous avons mené des expérimentations contrôlées et reproductibles à trois échelles d'investigation : au laboratoire, au niveau du microsite et en microcosmes de sol ainsi qu'au terrain en mésocosmes de sol. La méthodologie reposait également sur l'utilisation du marquage radioisotopique au ^{14}C pour caractériser et quantifier les différents processus impliqués dans les dynamiques de l'atrazine dans le sol.

De façon évidente, l'ensemble de l'étude démontre que les lombriciens, en interaction avec les microorganismes du sol, affectent significativement la dynamique de l'herbicide atrazine dans le sol. Les lombriciens, en facilitant l'adsorption de l'atrazine dans les microsites de sol qu'ils créent, diminuent la disponibilité et la mobilité de la molécule. Ils facilitent alors la persistance de l'atrazine dans le sol qui s'oppose et prédomine sur sa biodégradation par les microorganismes du sol.

Ces résultats sont liés à l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle créée par les lombriciens à différentes échelles de temps et d'espace dans le sol.

La première action mesurable des lombriciens à l'échelle des microcosmes et des mésocosmes est une redistribution plus hétérogène de l'atrazine dans le sol et sa migration plus en profondeur. Organismes ingénieurs, les lombriciens participent grandement à l'hétérogénéité structurale du sol en créant des microsites, galeries et turricules, de taille, formes et composition variables. Par exemple, à cette échelle, les galeries participent très précocement puis durablement à la redistribution et à la lixiviation de l'atrazine.

Suite à la redistribution de l'atrazine dans le sol, la seconde action mesurable des lombriciens à l'échelle spatiale inférieure des microsites, est une rétention accrue de la molécule atrazine et de ses résidus. La diffusion et par la suite le piégeage de l'atrazine dans les micropores, qui sont particulièrement abondants dans les parois de galeries (cutanes) et dans les turricules, peuvent contribuer à sa séquestration physique. L'enrichissement des turricules en matière organique non humifiée contribue à accroître la formation de résidus liés de l'atrazine dans ces microsites. La lixiviation de l'atrazine d'une part et la formation de résidus liés d'atrazine d'autre part conduisent à la soustraction partielle de molécules atrazine à la dégradation microbienne.

Les lombriciens contribuent aussi à la création d'une hétérogénéité fonctionnelle du sol qui affecte la minéralisation de l'atrazine. Dans les biostructures (galeries et turricules), l'enrichissement en matière organique et l'accroissement de la microporosité du sol augmentent respectivement l'adsorption et la séquestration des molécules et diminuent respectivement la disponibilité et l'accessibilité de l'atrazine pour les communautés microbiennes capables de dégrader

A l'échelle microscopique des microorganismes, l'action mesurable des lombriciens est une stimulation de l'activité, et une structuration des communautés microbiennes par modification de leur taille et de leur diversité. La modification majeure mesurée pour une des communautés capables de dégrader l'atrazine, *Pseudomonas* sp. ADP est une diminution de la taille après passage dans le tractus digestif. L'hétérogénéité fonctionnelle créée par les vers correspond également à une modification potentielle du fonctionnement des communautés microbiennes. En effet avec l'enrichissement en nutriments azotés (NO_3^- et NH_4^+) consécutif à la création des biostructures, la bactérie dégradante *Pseudomonas* sp. ADP est susceptible d'utiliser préférentiellement ces sources d'azote plus facilement disponibles que l'azote provenant de la dégradation du noyau de la molécule atrazine, pour sa croissance.

Cette étude souligne l'interdépendance des processus de rétention et de dégradation dans le devenir de l'atrazine dans les sols et ceci à différentes échelles spatiales et temporelles. Elle souligne également que les interactions entre macrofaune lombricienne et microflore du sol sont complexes, les lombriciens agissant autant sur la structure des communautés que sur leur métabolisme.

Nous démontrons par cette étude que les interactions biotiques édaphiques sont significativement impliquées dans le devenir et le comportement des molécules organiques de type herbicide dans le sol et nous concluons qu'elles ne peuvent plus être négligées dans un objectif de meilleure compréhension de l'écodynamique des polluants organiques pour en évaluer les risques *a priori*.

Sur le plan méthodologique, cette étude a ouvert aussi des interrogations quant à la généralisation des résultats d'une part et aux difficultés de leurs transferts aux échelles supérieures de terrain, d'autre part.

En ce qui concerne la redistribution et la disponibilité de la molécule, les résultats cohérents obtenus aux différentes échelles d'investigation sont probablement généralisables à une autre molécule organique de comportement proche de celui de l'atrazine. Une molécule avec un Koc et de solubilité proche aura un comportement proche : une faible mobilité et une affinité pour la matière organique.

Toutefois ne sont pas généralisables, les résultats relatifs à la communauté dégradant l'atrazine. Les conditions physico-chimiques particulières créées dans les microsites et le passage dans le tube digestif des lombriciens peuvent avoir un effet variable en fonction des bactéries et des champignons et par exemple en fonction des contraintes métaboliques strictes ou facultatives des bactéries. Les conditions d'oxygénation sont globalement aérobies dans les galeries (nitrification, Binet, 1993 ; nitrification et dénitrification, Parkin et Berry, 1999) et anaérobies dans les turricules jeunes (dénitrification, Elliott *et al.*, 1990) mais sont susceptibles d'évoluer avec le temps et les teneurs en eau (turricules frais vs turricules âgés). Elles peuvent donc influencer les activités microbiennes.

Du point de vue des lombriciens, nous avons d'emblée fait le choix de travailler à partir d'une communauté de deux espèces les plus abondantes en sol cultivés tempérés. Ces deux espèces ayant des modes d'action sur le sol bien différenciés, une hétérogénéité structurale satisfaisante par rapport à une situation naturelle de terrain a été obtenue dans les microcosmes comme dans les mésocosmes au terrain. Notre étude est donc de ce point de vue généralisable. En revanche vis à vis des interactions avec les microorganismes et donc du fonctionnement microbien, des différences entre espèces sont attendues y compris entre espèces d'une même catégorie écologique.

Nous avons également ciblé deux échelles d'étude celle du microcosme et celle du mésocosme. L'objectif était de valider les résultats obtenus au laboratoire en microcosme, par des situations expérimentales au terrain prenant davantage en compte la complexité et les conditions pluviométriques et thermiques de la parcelle. L'étude au terrain conforte les résultats obtenus au laboratoire : l'effet des vers sur le devenir de l'herbicide atrazine demeure mais est dilué à l'échelle supérieure des mésocosmes ; le mésocosme représente une quantité de sol 33 fois plus importante par comparaison avec le microcosme, il intègre aussi davantage la profondeur (40 cm vs 15 cm). Le défaut de bilan observé au terrain correspond vraisemblablement à la difficulté de piéger l'ensemble de l'atrazine minéralisée sans perturber le fonctionnement du dispositif et à l'impossibilité d'analyser l'ensemble du sol, en particulier le sol non remanié. Le transfert d'échelle nécessiterait semble-t-il de formuler et d'exprimer les mesures non pas en poids de sol mais en volume de sol ; par exemple, à quel volume fonctionnel de sol correspond 1 g de paroi de galeries ?

Même si l'effet des lombriciens est ou apparaît dilué par le transfert d'échelle, ils participent à l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des sols et leur influence est effective. Tous ces processus interviennent à différentes échelles et placent la macrofaune lombricienne comme un régulateur du devenir de l'atrazine dans les sols et probablement d'autres molécules organiques. Prendre en compte différentes échelles d'investigation apparaît nécessaire lorsqu'on veut étudier les processus biologiques lombriciens et microbiens et leurs interactions

avec des molécules organiques apportées sur les sols. Cela soulève une question plus générale d'écologie fonctionnelle : comment prendre en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle du processus de minéralisation de l'atrazine significativement observée à l'échelle des microsites de sol, pour en évaluer la portée dans le fonctionnement du sol à l'échelle de la parcelle ?

De nouvelles questions se posent à l'issue de ce travail pour mieux appréhender et évaluer le rôle régulateur des interactions macrofaune lombricienne / microflore des sols dans l'écodynamique de l'atrazine et plus généralement des herbicides.

Comment le vieillissement des biostructures (galeries et turricules) oriente-t-il à long terme la disponibilité de l'atrazine adsorbée d'une part et les communautés microbiennes dégradant l'atrazine tel que *Pseudomonas* sp. ADP, d'autre part ?

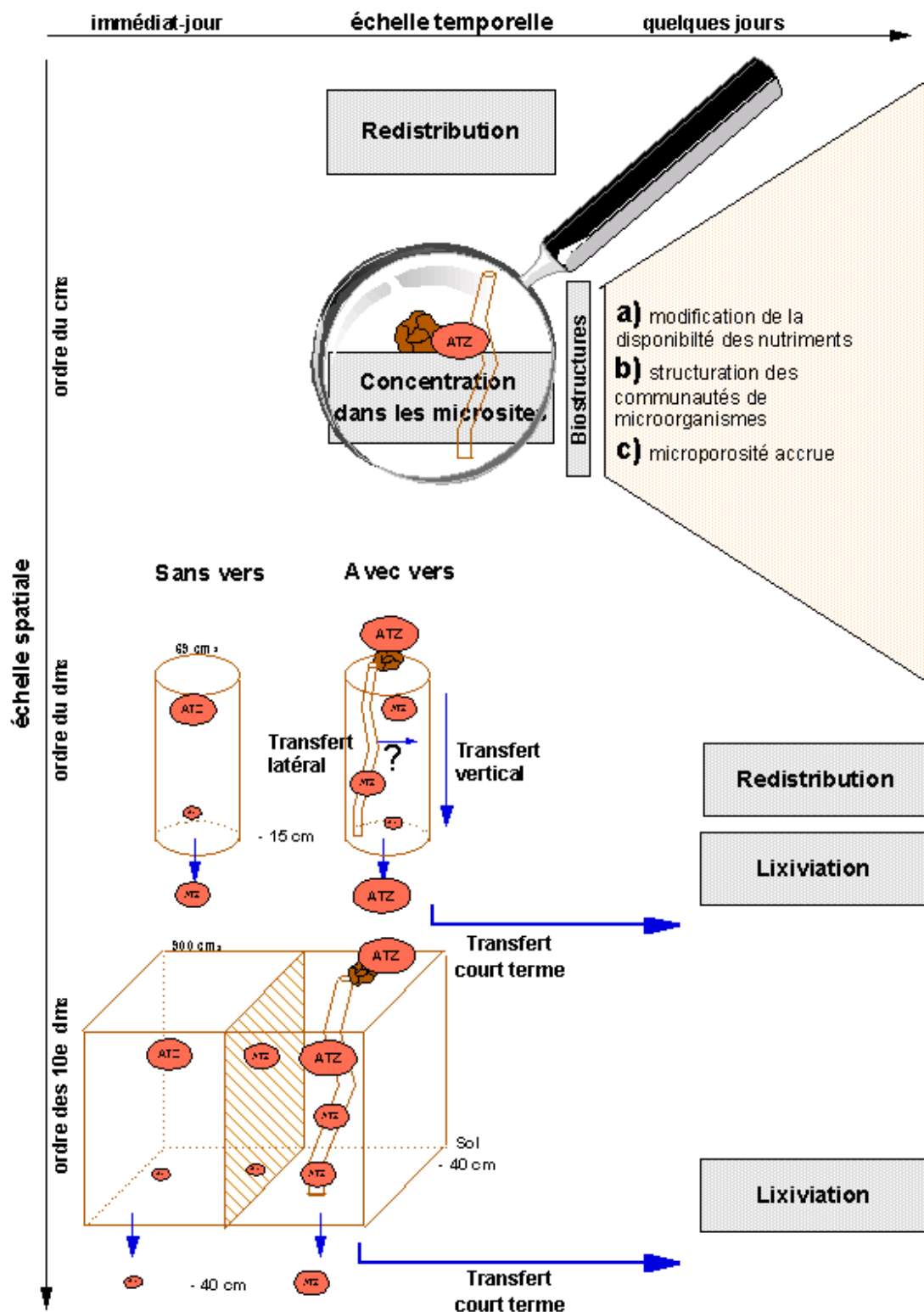
Pour appréhender les processus à long terme, il conviendrait après inoculation du sol avec *Pseudomonas* sp. ADP, et au cours du vieillissement des turricules et des galeries, de quantifier la communauté bactérienne et les gènes *Atz*. En parallèle, Il conviendrait de relier ces structures de communautés microbiennes avec i) les cinétiques de la minéralisation de l'atrazine, ii) les quantités de résidus non disponibles pour la minéralisation ainsi que iii) l'évolution des teneurs en azote (NH_4^+ , NO_3^-) qui pourraient participer au contrôle de l'expression des gènes *Atz*.

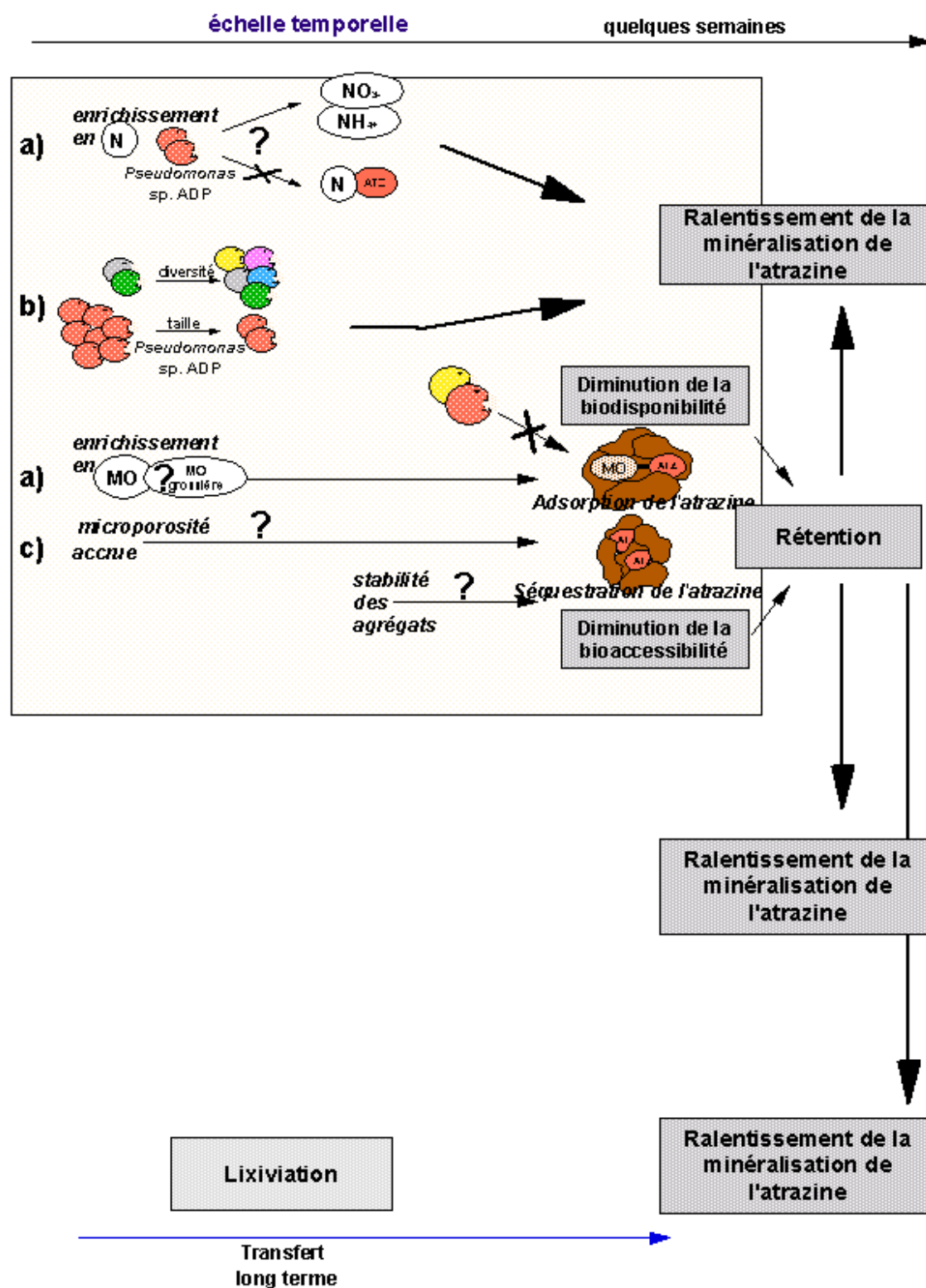
Comment d'autres microorganismes de la communauté dégradant l'atrazine, tels les champignons, répondent-ils aux contraintes et aux changements imposés par les communautés lombriciennes ?

Dans un souci de généralisation de cette étude et de manière à mieux appréhender l'implication de la macrofaune lombricienne dans l'atténuation et / ou la persistance des polluants organiques dans les sols cultivés, il conviendrait de tester les résultats obtenus avec d'autres microorganismes tels que les champignons qui sont hétérotrophes et d'autres assemblages d'espèces lombriciennes.

Pour une vision encore plus complète et pour appréhender davantage la complexité du terrain, il devient nécessaire d'ouvrir la réflexion aux interactions possibles et vraisemblables avec les systèmes racinaires des plantes, *i.e* aux interactions biotiques entres racines / macrofaune / microorganismes.

La drilosphère, peut être considérée comme l'équivalent fonctionnel de la rhizosphère qui sont des micro-environnements caractérisés par une activité microbiologique intense. L'activité est stimulée par une subdivision fine en lien avec le mélange de débris de litière avec la fraction minérale du sol, ainsi que par la production de mucus épidermique et intestinal. Ce matériel a des effets analogues aux exsudats racinaires de la rhizosphère (Lavelle et Spain, 2001). La rhizosphère du maïs stimule la dégradation de l'atrazine par augmentation de l'abondance des communautés dégradantes (Piutti *et al.*, 2002). Les lombriciens se nourrissent également dans la rhizosphère (Spain *et al.*, 1990, Binet *et al.*, 1997). On peut donc s'interroger sur la structuration des communautés microbiennes à la fois par la rhizosphère et la drilosphère : ces deux zones « hot spot » agissent-elles en synergie, en opposition ou indépendamment sur la taille, la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes des sols et en particulier sur les communautés impliquées dans le métabolisme des polluants organiques ?





REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDELHAFID R., HOUOT S. & BARRIUSO E. (2000)a - Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **32** : 389-401.

ABDELHAFID R., HOUOT S. & BARRIUSO E. (2000)b – How increasing availabilities of carbon and nitrogen affect atrazine behaviour in soils. *Biol. Fertil. Soils*, **30** : 333-340.

ABLAIN F. (2002) - Rôle des activités lombriciennes sur la redistribution des éléments métalliques traces issus de boues de station d'épuration dans les sols cultivés. *Thèse de Doctorat, Université de Rennes I*, 120p.

AKHOURI N. M., KLADIVKO E. J. & TURCO R. F. (1997) - Sorption and degradation of atrazine in middens formed by *Lumbricus terrestris*. *Soil Biology and Biochemistry*, **29** : 663-666.

ALEXANDER M. (1994) - Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego, CA. 302p.

ALEXANDER M. (1995) - How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science and Technology*, **29** : 2713-2717.

ALVEY S.A. & CROWLEY D.E. (1995) - Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen-source. *J. Environ. Qual.*, **24**: 1156-1162.

ANDREA M.M., PERES T.B., LUCHINI L.C. & PETTINELLI A. (2000) - Impact of long-term pesticide applications on some soil biological parameters. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **35**: 297-307.

ARMSTRONG D.E. & CHESTER G. (1967) – Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **31** : 61-66.

ASSAF A. A. & TURCO R. F. (1994) – Accelerate biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. *Biodegradation*, **5** : 29-35

BAILEY, G.W., & WHITE J.L. (1970) - Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soils. *Residue Reviews*, **32**: 29-92.

BALL, W.P. & ROBERTS P.V. (1991)a - Long-term sorption of halogenated organic-chemicals by aquifer material I: Equilibrium. *Environmental Science and Technology*, **25**: 1223-1237.

BALL W.P. & ROBERTS P.V. (1991)b - Long-term sorption of halogenated organic-chemicals by aquifer material II: Interparticulate diffusion. *Environmental Science and Technology*, **25**: 1237-1249.

BAROIS I., VILLEMEN G., LAVELLE P. & TOUTAIN F. (1993) – Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma*, **56**: 57-66.

BAROIS I. & LAVELLE P. (1986) - Changes in respiration rate and some physicochemical properties during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*, **18**: 539-541.

BARRIUSO E., SCHIAVON M., ANDREUX F. & PORTAL J.M. (1991) - Localization of atrazine non-extractable (Bound) residues in soil size fractions. *Chemosphere*, **22** : 1131-1140.

BARRIUSO E. & CALVET R. (1992) - Soil type and herbicides adsorption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **46**: 117-128.

BARRIUSO E., KOSKINEN W. & SORENSEN B. (1992) - Modification of atrazine desorption during field incubation experiments. *The Science of the Total Environment*, **123-124**: 333-344.

BARRIUSO E., BENOIT P. & BERGHEAUD V. (1994) - Role of soil fractions in retention and stabilization of pesticide in soils. In A. Coppin, G. Houins, L. Pussemier, & J.F Salembier (Eds) *Environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, pp 138-143. European Study Service, Rixensart, Belgium.

BARRIUSO E., EKLO O. M., IGLESIAS E. & HOUOT S. (1996) - Modification de la mobilité des pesticides dans les sols après addition de matières exogènes. *Actes des 5^e Journées Nationales de l'Etude des Sols. Association française pour l'Etude des Sols, Rennes*, 99-101.

BARRIUSO E. & HOUOT S. (1996) - Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, **28** : 1341-1348.

BARRIUSO E. & KOSKINEN W. C. (1996) - Incorporating non extractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**: 150-157.

BARRIUSO E., HOUOT S. & SERRA-WITTLING C. (1997) - Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pestic. Sci.*, **49** : 65-75.

BEARE M.H., COLEMAN D.C., CROSSLEY D.A., HENDRIX P.F., & ODUM P.E. (1995) - A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*, **170**:5–22

BECK A.J. & JONES K.C. (1995) - Kinetic constraints on the in-situ remediation of soils contaminated with organic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, **2**: 244-252.

BEKHI R.M. & KHAN S.U. (1986) – Degradation of atrazine by pseudomonas : N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal of agricultural and food chemistry*, **34**: 746-749.

BENOIT P. & PRESTON C.M. (2000) – transformation and binding of ¹³C and ¹⁴ C-labelled atrazine in relation to straw decomposition in soil. *Eur. J. Soil Sci.*, **51** : 43-54.

BERRY D.F. & BOYD S.A. (1985) - Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environmental Science and Technology*, **19**: 1132-1133.

BEST J.A., WEBER J.B. & MONACO T.J. (1975) – Influence on soil pH on s-triazine availability to plants. *Weed Sci.*, **23**: 378-382.

BEYERS R.J. (1963) – The metabolism of twelve aquatic laboratory microecosystems. *Ecological monographs*, **33**: 281-303.

BHANDARI G.S., RANDHAWA N.S. & MASKINA M.S. (1967) - On the polysaccharide content of earthworm casts. *Curr. Sci.*, **19** : 519-520.

BIDLEMAN T., WALLA M.D., ROURA R., CARR E. & SCHMIDT S. (1993) - Organochlorines pesticides and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere of the Ocean Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, **26**: 258-262

BINET F. (1993) - Dynamique des peuplements et fonctions des lombriciens en sols cultivés tempérés. *Thèse de doctorat, Université de Rennes 1*, 299p.

BINET F. & CURMI P. (1992) - Structural effects of *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae) on soil/organic matter system: micromorphological observations and autoradiographies. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**: 1519-1523.

BINET F. & TREHEN P. (1992) - Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (Oligochaete, Lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **24** : 1501-1506.

BINET F., HALLAIRE V. AND CURMI P. (1997) – Agricultural practices and the spatial distribution of earthworms in maize fields. Relationships between earthworm abundance, maize plants and soil compaction. *Soil Biology and Biochemistry*, **29**: 577-583.

BINET F., FAYOLLE L. & PUSSARD M. (1998) - Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, **27**: 79-84.

BINET F. & LE BAYON R.C. (1999).- Space-time dynamics in situ of earthworm casts under temperate cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**: 85-93.

BLAIR, J. M., PARMELEE, R. W. & LAVELLE P. (1995) - Influences of earthworms on biogeochemistry. In: Hendrix, P. F. (ed) *Earthworm Ecology and Biogeography in North America*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 127–158.

BLANCHART E. (1990) - Rôle fonctionnel des vers de terre dans la formation de la structure des sols de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire). *Thèse de doctorat, Université Rennes I*.

BLANCHART E., LAVELLE P. & SPAIN A. (1990) - Effects of biomass and size of *Millsonia anomala* (Oligochaeta : Acanthodrilidae) on particle aggregation in a tropical soil in the presence of *Panicum maximum*. *Biol. Fert. Soils*, **10**: 113-120.

BOLAN N. S. & BASKARAN S. (1996) - Characteristics of earthworm casts affecting herbicide sorption and movement. *Biol. Fert. Soils*, **22**: 367-372.

BOLLAG J. (1992) - Decontaminating soil with enzymes: An in situ method using phenolic and anilinic compounds. *Environmental Science and Technology*, **26**: 1876-1881.

BOUCHE M. B. & ALIAGA R. (1986) - Contre une dégradation physique et chimique des sols et pour leur optimisation économique, l'échantillonnage des lombriciens: une urgente nécessité. *La Défense des Végétaux*, **242**: 30-36.

BOUCHE M.B. (1972) - Lombriciens de France. Ecologie et systématiques. INRA Annales de Zoologie-écologie animale, Paris. 671 p.

BOUCHE M.B. (1977) - Stratégies lombriciennes. *Bull Ecol.*, Paris, **25** : 122-132

- BOUNDY-MILLS K.L., DE SOUZA M.L., MANDELBAUM R.T., WACKETT L.P. & SADOWSKY M.J.** (1997).- The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 916-923
- BOUQUARD C., OUAZZANI J., PROMÉ J.C., MICHEL-BRIAND Y. & PLESIAT P.** (1997).- Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 862-866.
- BROWN G.G.**, (1995) - How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil*, **170**: 209-231.
- BRUSSEAU M.L., JESSUP R.E. & RAO P.S.C.** (1991)a.- Non-equilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes. *Environmental Science and Technology*, **25**: 134-142.
- BRUSSEAU M.L., LARSEN T. & CHRISTENSEN T.H.** (1991)b.- Rate-limited sorption and non-equilibrium transport of organic chemicals in low organic carbon aquifer materials. *Water Resources Research*, **27**:1137-1145.
- BUCK C., LANGMAACK M. & SCHRADER S.** (1999).- Nutrient content of earthworm casts influenced by different mulch types. *European Journal of Soil Biology*, **35**: 23-30.
- BURGOS W.D., NOVAK J.T. & BERRY D.F.** (1996) - Reversible sorption and irreversible binding of naphthalene and a-naphthol to soil: elucidation of processes. *Environmental Science and Technology*, **30**:1205-1211.
- BYZOVA J. B.** (1965) - Comparative rate of respiration in some earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, **2**: 207-216.
- CALDERBANK A.** (1989) - The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Environmental Contamination and Toxicology*, **108**: 71-103.
- CARTER A.D.** (2000) - Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. *Weed Research*, **40** : 113-122.
- CHAMBRE D'AGRICULTURE DE BRETAGNE** (1999) - Du bon usage des produits phytosanitaires, le désherbage du maïs.

CHAPUIS-LARDY L., BROSSARD M., LAVELLE P. & SCHOULLER E. (1998) – Phosphorus transformations in a ferralsol through ingestion by *Pontoscolex corethurus*, a geophagous earthworm. *Eur. J. Soil Biol.*, **34**: 61-67.

CHAOUI H.I, ZIBILSKA L.M. & OHNO T. (2003) - Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability, *Soil Biol. Biochem.*, **35**: 295-302.

CHEVREUIL M., GAMOUNA M., TEIL M. J. & CHESTERIKOFF A. (1996) - Occurrence of organochlorides (PCBs) pesticides and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere in the fallout from urban and rural station of the Paris area. *The Science and the total Environment*, **182**: 25-37

COLEMAN D.C., REID C.P.P. & COLE C.V. (1983) - Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. In: Macfadyen, A. and Ford, E. D. (eds). *Advances in ecological research n°13*. Academic Press, New York, pp. 1-55.

COOK A.M. (1987) – Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, **46** : 93-116.

COOK A.M., BEILSTEIN P., GROSSENBACHER H. & HÜTTER R. (1985) - Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochemical Journal*, **231**: 25-30.

COOK A. M. & HÜTTER R. (1981) - s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, **29**:1135-1143.

COOKE A. & LUXTON M. (1980) - Effect of microbes on food selection by *Lumbricus terrestris*. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, **17** : 365-370.

CORTEZ J., HAMEED R. & BOUCHE M.B. (1989).- C and N transfer in soil with or without earthworms fed with ¹⁴C and ¹⁵N labelled wheat straw. *Soil Biol. Biochem.*, **21** : 491-497.

CPP (2001) - Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. <http://www.environnement.gouv.fr/ministere/comitesconseils/cppp-fiche-descriptive.htm>

CRAWFORD J.J., SIMS G.K., MULVANEY R.L. & RADOSEVICH M. (1998) - Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49** : 618-623.

DARWIN C.R. (1881) - The formation of vegetable mould through the action of worms, with observation of their habits. Murray, London.

DASH H.K., BEURA B.N. & DASH M.C. (1986) - Gut load, transit time, gut microflora, and turnover of soil, plant, and fungal material by some tropical earthworms. *Pedobiologia*, **29**: 10-12.

DASH M.C., MISHRA P.C. & BEHERA N. (1979) - Fungal feeding by a tropical earthworm. *Tropical Ecology*, **20**: 10-12.

DE SOUZA, M. L., WACKETT L. P. & SADOWSKY M. J. (1998) - The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2323-2326

DE SOUZA, M. L., WACKETT L.P., BOUNDY-MILLS K.L., MANDELBAUM R.T. & SADOWSKY M.J. (1995) - Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3373-3378

DEC J. & BOLLAG J. (1997) - Determination of covalent and non-covalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Science*, **162**: 858-874.

DECAENS T., RANGEL, A.F., ASAKAWA N. & THOMAS R.J. (1999) - Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biology and Fertility of Soils*, **30**: 20 – 28

DEMON M., SCHIAVON M., PORTAL J.M. & MUNIER-LAMY C. (1994) - Seasonal dynamics of atrazine in three soils under outdoor conditions. *Chemosphere*, **28**: 453-466.

DEROUARD L. (1993) – Effets comparés de trois espèces de vers de terre sur la structure physique d'un sol de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire). *Mémoire de DESS – Gestion des systèmes agro-sylvo-pastoraux – Université Paris XII.*

DEVERS M., SOULAS G. & MARTIN-LAURENT F. (2004) - Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*, **56**: 3-15.

DIDDEN W.A.M., MARINISSEN J.C.Y., VREEKEN-BUIJS M.J., BURGERS S.L.G.E. & DE FLUITER R. (1994) - Soil meso- and macrofauna in two agricultural systems: factors affecting population dynamics and evaluation of their role in carbon and nitrogen dynamics. *Agr. Ecosyst. Environ.*, **51**: 171-186.

DOHERTY P.J. & WARREN G.F. (1969) – The adsorption of four herbicides by different types of organic matter and a bentonite clay. *Weed Res.*, **9**: 20-26.

DOUBE B.M. & BROWN G.G. (1998) - Life in a complex community: functional interactions between earthworms, organic matter, microorganisms, and plant. *In* C. Edwards (Eds), *Earthworm Ecology*, Soil and Water Conservation Society Ankeny, Iowa., pp179-211

DOUBE B.M., STEPHENS P.M., DAVOREN C.W. & RYDER M.H. (1994) - Interaction between earthworms, beneficial soil microorganisms and root pathogens. *Appl. Soil Ecol.*, **1**: 3-10.

DOYLE R.C., KAUFMAN D.D. & BURT G.W. (1978) - Effect of dairy manure and sewage on ¹⁴C-pesticide degradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**: 987-989.

EDWARDS W. M., SHIPITALO M. J., TRAINA S. J., EDWARDS C. A. & OWENS L. B. (1992) - Role of *Lumbricus terrestris* (L.) burrows on quality of infiltrating water. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**: 1555-1561.

EDWARDS W.M., SHIPITALO M.J., OWENS L.B., & NORTON L.D. (1990) - Effect of *Lumbricus terrestris* L. burrows on hydrology of continuous no-till corn fields. *Geoderma*, **46**: 73-84.

EDWARDS W.M., SHIPITALO M.J., OWENS L.B., & NORTON L.D. (1989) - Water and nitrate movement in earthworm burrows within long-term no-till cornfields. *J. Soil and Water Conserv.*, **44**: 240-243.

EDWARDS C.A. & FLETCHER K.E. (1988) - Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **24**: 235-247.

EHLERS W. (1975) - Observations on earthworms channels and infiltration on tilled and untilled loess soils. *Soil Science Society of America Journal*, **119**: 242-249.

ELLIOT P.W., KNIGHT D. & ANDERSON J.M. (1990) – Denitrification in earthworms casts and soils from pastures under different fertilizer and drainage regimes. *Soil Biol. Biochem.*, **22**: 601-

605.

ELLIOT E.T. & COLEMAN D.C. (1988).- Let the soil work for us. *Ecological Bulletins*, **39**: 23-32.

ENTRY J.A., MATTSON K.G. & EMMINGHAM W.H. (1993) - The influence of N on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in grassland soils. *Biol Fertil Soils*, **16**: 179-182.

EU-FVO (The Food and Veterinary Office of the European Community) (2003) - Commission report shows stable level of pesticide residues in food in the European Union. *Results of the 2001 pesticide monitoring programme*.

http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/annual_eu/exp_summary2001_en.pdf

FADULLON F.S., KARNS J.S. & TORRENTS A. (1998) – Degradation of atrazine in soil by streptomycetes. *J. Environ. Sci. Health*, **33**: 37-49.

FARENHORST A. & BOWMAN B.T. (2000) - Sorption of atrazine and metolachlor by earthworm surface castings and soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **35**: 157-173.

FARENHORST A., TOPP E., BOWMAN B.T. & TOMLIN A. D. (2000)a - Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 23-33.

FARENHORST A., TOPP E., BOWMAN B.T. & TOMLIN A. D. (2000)b - Earthworm burrowing and feeding activity and the potential for atrazine transport by preferential flow. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 479 – 488.

FAYOLLE L. & STAWIECKI J. (1990) - Effet de deux molluscicides sur les vers de terre. *Phytoma*, **416**: 28 - 33.

FISCHER E. (1989) - Effects of atrazine and paraquat-containing herbicides on *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta). *Zool. Anz.*, **223**(5-6): 291-300.

FLEGEL M., SCHRADER S. & ZHANG H.Q. (1998) - Influence of food quality on the physical and chemical properties of detritivorous earthworm casts. *Appl. Soil Ecol.*, **9**: 263-269.

- FU M.H., MAYTON H., & ALEXANDER M.** (1994).- Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifer soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**: 749-753
- FÜHR F.** (1987) – Non-extractable pesticide residues in soil. In R. Greenhalgh, T.R. Roberts (eds), *Pesticide Sciences and Biotechnology*. Blackwell Scientific, Oxford, Great Britain, pp. 381-389.
- GASCUEL-ODOUX C., CROS-CAYOT S. & DURAND P.** (1995) - Spatial variations of sheet flow and sediment transport on an agricultural field. *Earth Surface Processes and Landforms*, **21**: 843-851.
- GEVAO B., MORDAUNT C., PEARCE T.G., SEMPLE K.T. & JONES K.C.** (2001) - Bioavailability of non-extractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environmental Science and Technology*, **35** : 501-507.
- GEVAO B., SEMPLE K.T. & JONES K.C.** (2000) - Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, **108** : 3-14.
- GUERIF J.** (1990) - Conséquences de l'état structural sur les propriétés et les comportements physiques et mécaniques. *Colloque de l'INRA*, **53** : 71-89.
- GUERIN W.F. & BOYD S.A.** (1992) – Differential bioavailability of soil-sorbed naphtalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1142-1152.
- GUO L., BICKI T.J., FELSOT A.S. & HINESLY T.D.** (1993) - Sorption and movement of alachlor in soil modified by carbon-rich wastes. *Journal of Environmental Quality*, **22**: 186-194.
- GURTNER V. & STANISICH V.A.** (1996) - New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S- 23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**: 3-16.
- GSCHWIND N.** (1992) - Rapid mineralization of the herbicide atrazine by a mixed microbial community. In *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*, pp 204-206. Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- HAIMI J. & EINBORK M.** (1992). Effects of endogeic earthworms on soil processes and plant growth in coniferous forest soil. *Biol. Fertil. Soils*, **13**: 6-10.
- HAIMI J. & HUHTA V.** (1990) - Effects of earthworms on decomposition processes in raw

humus forest soil: A microcosm study. *Biol. Fertil. Soils*, **10**: 178-183.

HANCE R.J. (1969) – Influence of pH, exchangeable cation, and the presence of organic matter on the adsorption of some herbicides by montmorillonite. *Can. J. Soil Sci.*, **49**: 357-364.

HANCE R.J. (1988) - Environmental chemistry of herbicides, *Volume I* (eds R. Grover), pp. 1-19. CRC Press, Boca Raton. 216p.

HARRIS C.I. (1967) - Fate of 2-chloro-s-triazine herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **15** (1): 157-162.

HAYAR S., MUNIER-LAMY C., SCHIAVON M. & BENOIT-GUYOT J. L. (1996) - Effet des facteurs physico-chimiques et/ou biologiques dans la mobilisation et la libération des résidus d'atrazine, *Actes des 5^e Journées Nationales de l'Etude des Sols. Association française pour l'Etude des Sols, Rennes*, 113-114.

HAYES T.B., COLLINS A., LEE M., MENDOZA M., NORIEGA N., STUART A.A & VONK A. (2002) - Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 5476-5480.

HICKEY W. J., FUSTER D. J. & LAMAR R. T. (1994) - Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biology and Biochemistry*. **26** : 1665-1671.

HINDELL R.P., MCKENZIE B.M. & TISDALL J.M. (1997) - Influence of drying and ageing on the stabilization of earthworms (Lumbricidae) casts. *Biol Fertil. Soils*, **25**: 27-35.

HOOGHE R.J., DEVOS S. & PETERS E. (2000) - Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences*, **66** (26):2519-2525.

HOUOT S., BARRIUSO E. & BERGHEAUD V. (1998) - Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biol. Biochem.*, **30** : 2147-2157.

HOUOT S., TOPP E., YASSIR A. & SOULAS G. (2000) - Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 615-625.

HUANG P.M., BERTHELIN J., BOLLAG J.M., MCGILL W.B. & PAGE A.L. (1995) – Environmental impact of soil component interactions, Natural and Anthropogenic Organics (volume 1). CRC Lewis Publishers, London.

IFEN (2002) Les pesticides dans les eaux, bilan annuel 2002. Jacques Le Seigneur V. (Ed.) Etudes et travaux n°36 IFEN Orléans.

JAMET P. & DELEU R. (1993) - Environmental fate of pesticides. Behaviour of pesticides in soil. *Agro-Food Industry Hi-Technology*, **May-June 1993** :18-21.

JEGOU D. (1998).- Rôle fonctionnel de quatre espèces lombriciennes dans la structuration du sol et dans les transferts de carbone. *Thèse de Doctorat, Université de Rennes I*, 153 p.

JEGOU D., CLUZEAU D., BALESDENT J. & TREHEN P. (1998) - Effect of four ecological categories of earthworms on carbon transfer in soil. *Applied Soil Ecology*, **206**: 1-7.

JONES C.G., SHACHAK M. (1994) - Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**, 373-386.
JOSCHKO M., DIESTEL H., & LARINK O. (1989) - Assessment of earthworm efficiency in compacted soil with a combination of morphological and soil physical measurements. *Biol. Fertil. Soils*, **8**: 191-196.

JOSCHKO M., SOCHTIG W. & LARINK O. (1992) – Functionnal relationship between earthworm burrow and soil water movment in colum experiments. *Soil Biol. Biochem.*, **12**: 1545-1547.

JUDAS M. (1992) - Gut content analysis of earthworms (Lumbricidae) in a beechwood. *Soil Biol. Biochem.*, **24** : 1413-1417.

KANG B.T. & OJO A. (1996) – Nutrient availability of earthworm casts collected from under selected woody agroforestry species. *Plant Soil*, **178** : 113-119.

KAUFMAN D.D. & BLAKE J. (1970) – Degradation of atrazine by soil fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **2**: 73-80.

KAUFMAN D.D. & KEARNEY P.C. (1970) – Microbial degradation of s-triazine herbicides. *Residues Rewiews*, **32**: 235-265.

KELLS J.J., RIECK C.E., BLEVINS R.L. & MUIR M.M. (1980) – Atrazine dissipation as affected by surface pH and tillage. *Weed Sci.*, **28**: 101-104.

KHAN S.U. (1978) - The interaction of organic matter with pesticides. *In* Khan S. U. & Schnitzer M. (Eds.) *Soil Organic Matter: Development in Soil Science*, 137-171p.

KHAN S.U. & HAMILTON H.A. (1980) – Extractable and bound (nonextractable) residues of prometryn and its metabolites in an organic soil. *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 126-132.

KHAN S.U. & IVARSON K.C. (1981) – Microbiological release of unextracted (bound) residues from an organic soil treated with prometryn. *J. Agric. Food Chem.*, **29**: 1301-1303.

KLINT M., ARVIN E. & JENSEN B.K. (1993) - Degradation of the pesticides mecoprop and atrazine in unpolluted sandy aquifers. *J. Environ. Qual.*, **22**: 262-266

KRETZSCHMAR A. (1989) – Galeries des lombriciens en réseaux: structures fonctionnelles et signatures comportementales. *Thèse de l'Université Paris-Sud – Orsay*, 228 p.

KRETZSCHMAR A. (1988) – Structural parameters and functional patterns of simulated earthworms burrow systems. *Biol. Fertil. Soils*, **6** : 252-261.

KRETZSCHMAR A. (1978) - Quantification écologique des galeries de lombriciens. Techniques et premières estimations. *Pedobiologia*, **18**: 31-38

LADD J.N., FOSTER R.C. & SKJEMSTAD J.O. (1993) – Soil structure : carbone and nitrogen metabolism. *Geoderma*, **56**: 401-434.

LAIRD D.A., BARRIUSO E., DOWDY R.H. & KOSKINEN W.C. (1992) - Adsorption of atrazine on smectites. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **56**: 62–67.

LAVELLE P. (1978) - Les vers de terre de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire) : peuplements, populations et fonctionnement dans l'écosystème. *Thèse d'Etat, Paris VI*, Publication du Laboratoire de Zoologie de l'ENS. 301p.

LAVELLE P. (1981) - Stratégie de reproduction chez les vers de terre. *Acta Oecol. Gener.*, **2**: 117-133.

LAVELLE P. (1997) - Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem function. *Advances in ecological soil research*, **27**: 93-132.

LAVELLE P., BIGNELL D., LEPAGE M., WOLTERS V., ROGER P., INESON P. & HEAL O.W. (1997) – Soil function in a changing world : the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. of Soil Biol.*, **33**: 159-193.

LAVELLE P., PASHANASI B., CHARPENTIER F., GILOT C., ROSSI J.P., DEROUARD L., ANDRE J., PONGE J.F. & BERNIER N. (1998) - Large Scale effects of earthworms on organic matter and nutrient dynamics. *In* C.A. Edwards (Eds.), *Earthworm Ecology*, Soil and Water Conservation Society Ankeny, Iowa, pp 103-122.

LAVELLE P. & SPAIN A.V. (2001). Soil ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 654p.

LEE K.E. (1985) - Earthworms. Their Ecology and relationship with soils and land use. Academic Press, Sydney. 411 p.

LISKOVA A., WAGNEROVA J., TULINSKA J. & KUBOVA J. (2000) - Effect of the herbicide atrazine on some immune parameters in mice. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, **18**: 235-240.

LOWDER S.W. & WEBER J.B. (1972) – Atrazine efficacy and longevity as affected by tillage, liming, and fertiliser type. *Weed Sci.*, **30**: 273-280.

LUNT H.A. & JACOBSON M.G.M. (1945) - The Chemical composition of earthworm casts. *Soil Sci.*, **58**: 367-375.

Mc GREDIE T.A. & PARKER C.A. (1991) - The potential of the exotic earthworm *Apporectodea trapezoides* and *Microscolex dubius* for improving the physical condition of soils in the western australian wheatbelt. Report of research during 1988-90. *Soil science and plant nutrition school of agriculture*. University of Western Australia.

Mc KENZIE B.M. & DEXTER A.R. (1993) - Size and orientation of burrows made by earthworms *Aporrectodea rosea* and *A. caliginosa*. *Geoderma*, **56**, 233-241.

MANDELBAUM R.T., ALLAN D.L. & WACKETT L.P. (1995) - Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1451–1457

MANDELBAUM R.T., WACKETT L.P. & ALLAN D.L. (1993) - Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1695-1701

MARINISSEN J.C.Y. (1995) - Earthworms, soil-aggregates and organic matter decomposition in agro-ecosystems in the Netherlands. *Thèse d'Université, Wageningen Agricultural University*, The Netherlands, pp. 153.

MARINISSEN J.C.Y. & DEXTER A.R. (1990) - Mechanisms of stabilization of earthworm casts and artificial casts. *Biol Fertil Soils.*, **9**: 163-167.

MARINISSEN J. C. Y., NIJHUIS E. & van BREEMEN N. (1996) - Clay dispersability in moist earthworm casts of different soils. *Applied Soil Ecology*, **4**: 83-92.

MARTIN-LAURENT F., PHILIPPOT L., HALLET S., CHAUSSOD R., GERMON J.C., SOULAS G. & CATROUX G. (2001) - DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2354-2359.

MARTINEZ B., TOMKINS J., WACKETT L., WING R., & SADOWSKY M. (2001) - Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. ADP. *J. Bacteriol.* **183**: 5684-5697.

MARTINEZ-IÑIGO M.J. & ALMENDROS G. (1992) - Pesticide sorption in soils treated with evergreen oak biomass at different humification stages. *Communication in Plant Science and Analysis*, **23**: 1717-1719.

MEHARG A. A. (1996) - Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biol. Biochem.*, **28**: 555-559.

MINITAB (1998) - Logiciel d'analyse statistique. Version 13.31.

MOUGIN C., LAUGERO C., ASTHER M., DUBROCA J., FRASSE P. & ASTHER M. (1994) - Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:705-708.

MULONGOY K. & A. BEDORET (1989) - Properties of worm casts and surface soils under various plant covers in the humid tropics. *Soil Biology And Biochemistry*, **21**(2): 197-204.

NEWCOMBE D.A. & CROWLEY D.E. (1999) - Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** : 877-882.

ORAZOVA M.K., SEMENOVA T.A. & TIUNOV A.V. (2003) - The microfungus community of *Lumbricus terrestris* middens in a linden (*Tilia cordata*) forest. *Pedobiologia*, **47**: 27-32.

PAN (2001) <http://www.pan-africa.sn/francais/intriaz.htm>

PARKIN T.B. & BERRY E.C. (1999) - Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biol. Biochem.*, **31**: 1765-1771.

PARLE J.N. (1963a) - Micro-organisms in the intestines of earthworms. *J. Gen. Microbiol.*, **31** : 1-11.

PARLE J.N. (1963b) - A microbiological study of earthworm casts. *J. Gen. Microbiol.*, **31** : 13-22.

PARMELEE R.W., BOHLEN P.J. & BLAIR J.M. (1998) – Earthworms and nutrient cycling processes : Integrating across the ecological hierarchy. In C.A. Edwards (Eds.) *Earthworm Ecology*, St Lucie Press, Boca Raton, pp. 123-147.

PIEARCE, T. G., AND M. J. PHILLIPS. (1980) - The fate of ciliates in the earthworm gut: an in vitro study. *Microb. Ecol.* 5:313-319.

PIGNATELLO J.J. & XING B. (1996) - Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology*, **33**: 906-910.

PIUTTI S., HALLET S., ROUSSEAU S., PHILIPPOT L., SOULAS G. & MARTIN-LAURENT F. (2002) - Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biol. Fertil. Soils*, **36**: 434-441.

PRADO A.G.S. & AIROLDI C. (2000) - Effect of the pesticide 2,4-D on microbial activity of the soil monitored by microcalorimetry", *Thermochim. Acta*, **349**:17-22

PUSSEMIER L, GOUX S, VANDERHEYDEN V, DEBONGNIE P, TRESINIE I, FOUCART G. (1997) - Rapid dissipation of atrazine in soils taken from various maize fields. *Weed Research*, **37** (3): 171-179.

- RADOSEVICH M., TRAINA S. J. & TUOVINEN O. H.** (1997) - Atrazine mineralization in laboratory-aged microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria. *Journal of Environmental Quality*, **26**: 206-214.
- RADOSEVICH M., TRAINA S. J., HAO Y.-L. & TUOVINEN O. H.** (1995) - Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 297-302
- ROBERTS T.R., KLEIN W., STILL G.G., KEARNEY P.C., DRESCHER N., DESMORAS J., ESSER H.O., AHARONSON N. & VONK J.W.** (1984) - Non-extractable pesticide residues in soil and plants. *Pure Appl. Chem.* **56**: 945-956.
- ROTH C. & JOSCHKO M.** (1991) - A note of the reduction of runoff from crusted soils by earthworm burrows and artificial channels. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **154**: 101-105.
- ROUELLE J. & RANDRIAMAMONJIZAKA J.L.** (1983) - Recherches sur les fecès. In : Ph. Lebrun (Ed), *New trends in Soil Ecology*. Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve. rev : 608-609.
- SADOWSKY M.J., DESOUZA M.L., TONG Z. & WACKETT L.P.** (1998) - AtzC is a member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J. Bacteriol.*, 180:152-158.
- SANTRUCKOVA H., HEINEMEYER O. & KAISER E.A.** (1993) - The influence of soil compaction on microbial biomass and organic carbon turnover in micro- and macroaggregates. *Geoderma*, **56**: 587-598.
- SANUSI A., MILLET M., WORTHMAN H. & MIRABEL P.** (1997).- Atmospheric contamination by pesticides: determination in the liquid, gaseous and particle phases. *Environmental Science and Pollution Research*, **4** (3) 172-180
- SATCHELL J.E.** (1967). Lumbricidae. In: Burges, A. and F. Raw (eds.). *Soil Biology*. Academic Press. New York, NY. pp. 259- 322.
- SCHEU S.** (1987) - Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (Lumbricidae). *Biology and Fertility of Soils* **5**: 230-234.

- SCHEU S.** (1991) - Mucus excretion and carbon turnover of endogeic earthworms. *Biol. Fertil. Soils*, **12**: 217-220.
- SCHEUNERT I.** (1992) - Transformation and degradation of pesticides in soil. *In* : Terrestrial behavior of pesticides. *Chemistry of Plant Protection, Springer-Verlag, Berlin*. **8**: 77-103.
- SCHIAVON M.** (1988) - Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine in soil using ¹⁴C ring-labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **15**:55–61.
- SCHMIDT O.** (1994) – Investigation of earthworms (Lumbricidae) for delivery *Pseudomonas corrugate*, a biocontrol agent fo wheat tak-all. *M.Sc. thesis, Aberdeen University, U.K.*
- SEGHERS D., VERTHÉ K., REHEUL D., BULCKE R., SICILIANO S.D., VERSTRAETE W.& TOP E.M.** (2003) - Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**(2): 139-146.
- SENESI N.** (1992) - Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of the Total Environment*, **123-124**, 63-76.
- SENESI N. & MIANO T.M.** (1989) – Humis substances in the global environment and applications on human health. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1368 p.
- SHARPLEY A.N. & SYERS J.K.** (1976) - Potential role of earthworm casts for the phosphorus enrichment of runn-off waters. *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 341-346.
- SHAW C. & PAWLUCK S.** (1996) - The developpment of soil structure by *Octolasion tyrtaeum*, *Aporrectodea turgida* and *Lumbricus terrestris* in parent materials belonging to different textural classes. *Pedobiologia*, **29**: 327-339.
- SHIAVON M.** (1988) – Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and hydroxyatrazine in soil using C14 ring-labelled compounds under outdoor conditions. *Ecotox. Environ. Safety*, **15**: 55-61.
- SHIPITALO M. J. & PROTZ R.** (1989) - Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma*, **45** : 357-374.

SHRÄDER S., JOSCHKO M., KULA H. & LARINK O. (1995) - Earthworm effects on soil structure with emphasis on soil stability and soil water movement. *In Soil structure – Its development and function*. Lewis Publishers., p 109-133.

SIGUA G.C., ISENSEE A.R., SADEGHI A.M. & IM G.J. (1995) - Distribution and transport of atrazine as influenced by surface cultivation, earthworm population, and rainfall pattern. *Chemosphere*, **31**(10): 4237-4242.

SIMON F. (1995) - Analyse des facteurs de risques de transferts de pesticides dans les paysages. Etablissement d'une hiérarchie de ces risques: application à des bassins versants. *Mémoire de fin d'études. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes*, Rennes, France.

SIMS R.W. & GERARD B.M. (1985).- Earthworms. Keys and notes for identification and study on the species. Brill and Backhuys, London.

SKIPPER H.D., GILMOUR C.M. & FURTICK W.R. (1967) - Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. *Soil Science Society of America Proceedings* **31** : 653-656.

SKIPPER H.K. & VOLK H.K. (1972) - Biological and chemical degradation of atrazine in three Oregon soils. *Weed Science*. **20**:344–347.

SMITH S.C., AINSWORTH C.C., TRAINA S.J. & HICKS R.J. (1992) - Effect of Sorption on the Biodegradation of Quinoline. *Soil Sci Soc Am J*. **56** : 737-746.

SOKAL R.R & ROHLF F.J. (1981) - Biometry, 2nd Edition. WH Freeman & Company, New York.

SORENSEN B.A., KOSHINEN W.C., BUHLER D.D., WYSE D.L., LUESCHEN W.E. & JORGENSON M.D. (1994) - Formation and movement of ¹⁴C-atrazine degradation products in a clay loam soil in the field. *Weed. Science*, **42**: 618-624.

SOULAS G. (1999) - Pesticide biodegradability in soil : basic concepts for bioremediation applications. *Colloque Biodépol'99 – Rennes, France – 26 & 27 octobre 1999*.

SPAIN A.V., SAFFIGNA P.G. & WOOD A.W. (1990) – tissue carbon sources for *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) in a sugarcane ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, **22**: 703-706.

- SPIERS G.A., GAGNON D., NASON G.E., PACKEE E.C. & LOUISER J.D.** (1986) - Effects and importance of indigenous earthworms on decomposition and nutrient cycling in coastal forest ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research*, **16**: 983-989.
- STEHOUWER R. C., DICK W. A. & TRAINA S. J.** (1993) - Characteristics of earthworm burrow lining affecting atrazine sorption. *Journal of Environmental Quality*, **22** : 181-185.
- STEHOUWER R. C., DICK W. A. & TRAINA S. J.** (1994) - Sorption and retention of herbicides in vertically oriented earthworm and artificial burrows. *Journal of Environmental Quality*, **23** : 286-292.
- STORK N.E. & EGGLETON P.** (1992) - Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *Am.J.Alt.Agr.*, **7**: 38-47.
- STRUTHERS J. K., JAYACHANDRAN K. & MOORMAN T. B.** (1998) - Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3368-3375.
- SYERS, J.K. & SPRINGETT, J.A.** (1983) - Earthworm ecology in grassland soils. *In*: Satchell, J.E., (Ed.), *Earthworm Ecology*, Chapman and Hall, London
- SYERS J.K., SHARPLEY A.N., & KEENEY D.R.** (1979) - Cycling of nitrogen by surface-casting earthworm in pasture ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, **1**:301-307.
- TARRANT K. A., FIELD S. A., LANGTON S. D. & HART A. D. M.** (1997) - Effects of earthworm populations of reducing pesticide use in arable crop rotations. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 657-661.
- TASLI S.** (1995) - Devenir de l'atrazine en culture de maïs : Etudes en plein champ - Site de la côte Saint André, Isère, France - et au laboratoire. Recherche de solutions alternatives de traitement. *Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier- Grenoble1*, 188p.
- TEXIER C., CLUZEAU D., SEUX R. & TRÉHEN P.** (1995) – Influence of aldicarb kinetics on earthworm activities in experimental microcosms. *Acta Zool. Fennica*, **196**: 290-296.
- TILMAN D.** (1999) – Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices *the National Academy of Sciences colloquium "Plants and*

Population: Is There Time? held December 5-6, 1998, at the Arnold and Mabel Beckman Center in Irvine, CA. **96**, Issue 115995-6000

TIUNOV A.V. & DOBROVOLSKAYA T.G. (2002) - Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia*, **46**: 595-605.

TIUNOV A.V. & KUZNETSOVA N.A. (2000) - Environmental activity of anecic earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and spatial organization of soil communities. *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, **(5)**: 607-616.

TIUNOV, A.V. & SCHEU, S. (2000)a - Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): a laboratory experiment. *Applied Soil Ecology* **14**: 17–26.

TIUNOV, A., SCHEU, S. (2000)b - Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 265–275.

TIUNOV A.V. & SCHEU S. (1999) - Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.*, **31**: 2039-2048.

TIWARI S.C., TIWARI B.K. & MISHRA R.R. (1989) - Microbial populations, enzyme activities and nitrogen-phosphorus-potassium enrichment in earthworm casts and in the surrounding soil of a pineapple plantation. *Biol. Fert. Soils*, **8**: 178-182.

TOMLIN A.D., SHIPITALO M.J., EDWARDS W.M. & PROTZ R. (1995) - Earthworms and their influence on soil structure and infiltration. In: Hendrix P.F. (ed.) *Earthworm ecology and biogeography in North America*. Boca Raton, FL, Lewis Publ., pp159-183.

TOPP E., MULBRY W.M., ZHU H., HOUR S.M. & CUPPELS D. (2000) - Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp. isolated from agricultural soils. *Appl Environ Microbiol.*, **66**(8):3134-3141.

TREVISAN M., MONTEPIAINI C., RAGOSSA L., BARTOLETTI C., LOANNILL E. & DEL RE A. A. M. (1993) - Pesticides in rainfall and air in Italy. *Environmental Pollution*, **80**: 31-39

UIPP – UPJ (2001) - Synthèse OPECST 2001 dans Miquel G.; Revol H. Rapport 215 tome 2 (2002-2003) - Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. <http://www.senat.fr>

URBANEK J. & DOLEZAL F. (1992) – Review of some case studies on the abundance and on the hydraulic efficiency of earthworm channels in Czechoslovak soils, with reference to the subsurface pipe drainage. *Soil Biol. Biochem.*, **24**: 1563-1571.

VANDERHEYDEN V., DEBONGNIE P. & PUSSEMIER L. (1997) - Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pestic. Sci.* **49**:237–242.

VAN HOOF P. (1983) – Earthworms activity as cause of splash erosion in Luxembourg forest. *Geoderma*, **31**: 195-204.

WEBER J.B., WEDD S.B. AND WARD T.M. (1969) – Adsorption of s-triazines by soil organic matter. *Weed Sci.*, **17**: 417-421.

WENK M., BAUMGARTNER T., DOBOVSEK J., FUCHS T., KUCZERA J., ZOPFI J. & STUCKI G. (1998) - Rapid atrazine mineralisation in soil slurry and moist soil by inoculation of an atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. Strain. *Appl. Microb. Biotech.*, **49**: 624-630

WEST L.T., HENDRIX P.F. & BRUCE R.R. (1991) – Micromorphic observation of soil alteration by earthworms. *Agr. Ecosyst. Environ.*, Elsevier Science Publishers, B. V., Amsterdam.

YANZE-KONTCHOU C. & GSCHWIND N. (1994) - Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microb.*, **60**: 4297-4302.

YASSIR A., RIEU C. & SOULAS G. (1998) – Microbial N-dealkylation of atrazine : effect of exogeneous organic substrates and behaviour of the soil microflora. *Pestic. Sci.*, **54**: 75-82.

ZHANG H. & SCHRADER S. (1993) – Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biol. Fertil. Soils*, **15**: 229-234.

ZHANG Q. L. & HENDRIX P. F. (1995) - Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) effects on carbon flux in soil. *Soil Science Society of America Journal*, **59**:816-823

ZHANG X., WANG J., XIE H., WANG J. & ZECH W. (2003) – Comparison of organic compounds in the particle-size fractions of earthworm casts and surrounding soil in humid Laos. *Appl. Soil Ecol.*, **23**: 147-153.

ANNEXES

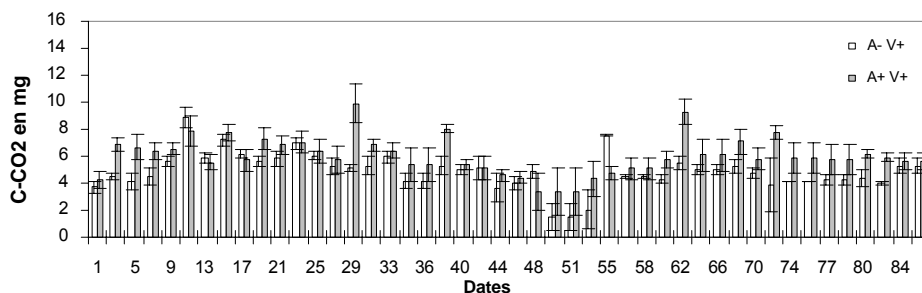
Annexe 1 : quantité de radioactivité apportée et poids de chaque microsite de sol, pour l'incubation dans l'Exp. 2.

Microsites	11 jours		21 jours		32 jours		40 jours		50 jours		60 jours		
	QtéSol	Qté Ra Appl	QtéSol	Qté Ra Appl	QtéSol	Qté Ra Appl	QtéSol	Qté Ra Appl	QtéSol	Qté Ra Appl	QtéSol	Qté Ra Appl	
	(g eq sec)	(Bq)	(g eq sec)	(Bq)	(g eq sec)	(Bq)	(g eq sec)	(Bq)	(g eq sec)	(Bq)	(g eq sec)	(Bq)	
répétition 1	V.2	10,20	8779,31	10,34	8707,35	10,31	8779,31	10,32	8779,31	10,23	8707,35	10,36	8779,31
	V.5	10,14	8779,31	10,33	8851,27	10,23	8779,31	10,22	8779,31	10,16	8707,35	10,06	8779,31
	V.10	10,03	8779,31	10,10	8779,31	9,99	8779,31	10,06	8779,31	9,87	8707,35	9,25	8779,31
	V.15	9,75	8707,35	10,01	8851,27	10,05	8779,31	10,04	8779,31	9,87	8707,35	10,06	8851,27
	V.T	1,27	1079,42	5,52	4857,41	6,90	6008,79	16,27	14302,36	10,72	9265,05	16,90	14770,11
	V.G	8,44	7627,93	9,91	8779,31	9,94	8779,31	9,95	8779,31	9,81	8707,35	9,92	8779,31
répétition 2	V.2	9,26	8779,31	10,27	8779,31	10,26	8779,31	10,35	8779,31	10,18	8707,35	10,32	8779,31
	V.5	8,59	8707,35	10,15	8779,31	10,18	8851,27	10,29	8779,31	10,17	8707,35	10,27	8779,31
	V.10	10,03	8779,31	9,95	8779,31	10,01	8779,31	9,93	8563,43	10,13	8707,35	10,28	8779,31
	V.15	9,83	8707,35	10,01	8779,31	9,93	8779,31	9,92	8779,31	9,99	8707,35	10,36	8851,27
	V.T	2,53	2158,85	13,37	11981,60	16,43	14572,22	12,07	10398,45	6,68	5595,01	15,38	13348,87
	V.G	7,02	6116,73	9,39	8347,54	9,94	8707,35	9,29	8203,62	9,85	8707,35	9,87	8779,31
répétition 3	V.2	10,22	8779,31	10,00	8779,31	10,18	8707,35	10,30	8779,31	10,11	8707,35	10,39	8779,31
	V.5	10,10	8779,31	10,12	8779,31	10,22	8779,31	10,24	8779,31	9,72	8491,47	10,31	8779,31
	V.10	9,94	8779,31	11,00	8779,31	10,07	8779,31	10,14	8779,31	9,44	8707,35	10,30	8779,31
	V.15	9,88	8779,31	9,91	8779,31	9,97	8779,31	10,05	8779,31	9,52	8491,47	10,15	8779,31
	V.T	2,05	1727,08	7,19	6494,53	3,83	3400,18	5,62	4749,46	16,50	14374,32	15,50	13492,80
	V.G	8,43	7484,00	9,72	8635,39	9,94	8707,35	9,95	8779,31	7,67	6872,33	9,90	8779,31
répétition 1	S.2	10,26	8779,31	10,04	8707,35	10,09	8779,31	10,23	8779,31	10,05	8707,35	10,59	8851,27
	S.5	10,17	8779,31	9,87	8707,35	10,04	8851,27	10,54	9121,13	9,96	8707,35	10,42	8779,31
	S.10	9,93	8707,35	9,92	8779,31	10,00	8779,31	10,03	8779,31	9,80	8707,35	10,21	8851,27
	S.15	10,03	8851,27	9,86	8779,31	10,00	8779,31	10,04	8779,31	9,83	8707,35	10,17	8851,27
répétition 2	S.2	12,09	8707,35	10,09	8779,31	10,11	8779,31	10,23	8779,31	10,14	8707,35	10,58	8851,27
	S.5	10,01	8779,31	9,99	8779,31	10,07	8779,31	10,12	8779,31	10,10	8707,35	10,41	8779,31
	S.10	9,94	8779,31	9,90	8779,31	10,09	8851,27	10,01	8779,31	10,06	8707,35	10,27	8779,31
	S.15	9,85	8779,31	9,97	8779,31	10,04	8851,27	10,00	8851,27	9,96	8707,35	10,15	8779,31
répétition 3	S.2	9,98	8779,31	10,16	8779,31	10,18	8779,31	10,20	8779,31	10,19	8707,35	10,18	8779,31
	S.5	9,89	8779,31	9,97	8707,35	10,06	8779,31	10,10	8779,31	10,14	8707,35	10,18	8779,31
	S.10	9,82	8779,31	9,91	8707,35	9,94	8779,31	10,02	8779,31	10,03	8707,35	10,17	8779,31
	S.15	9,84	8779,31	9,88	8779,31	9,86	8707,35	9,93	8779,31	9,92	8707,35	10,09	8779,31

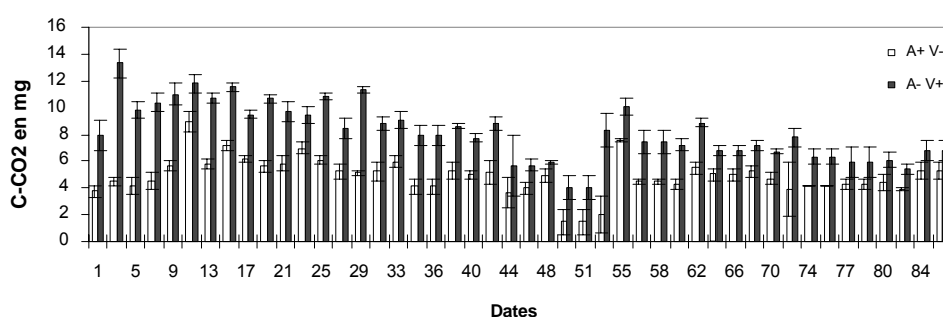
Annexe 2

Dynamique du carbone minéralisé Exp.1

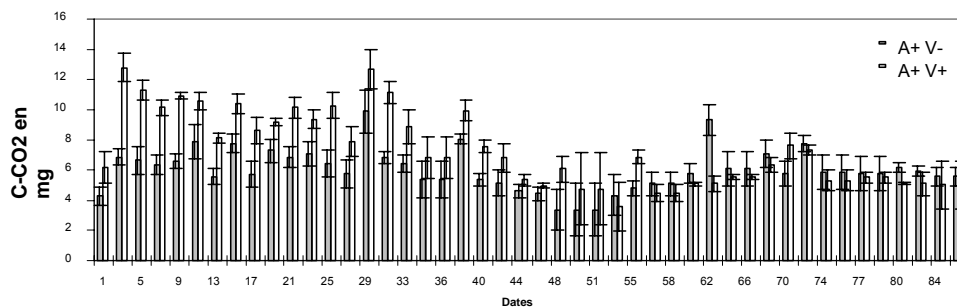
Carbone minéralisé sur sol seul



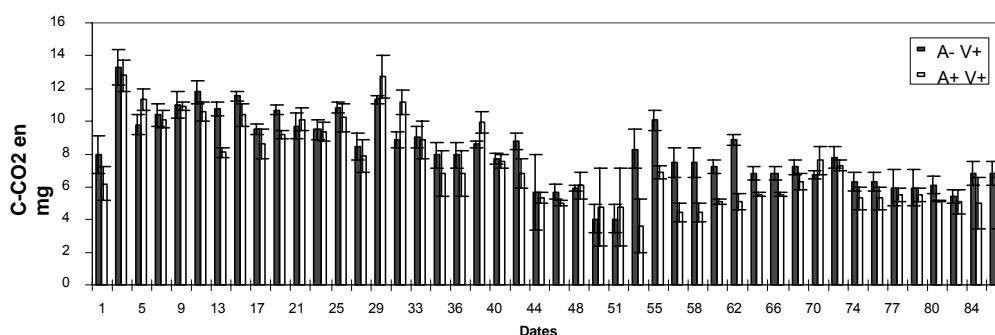
Carbone minéralisé sur sol sans atrazine



Carbone minéralisé sur sol avec atrazine



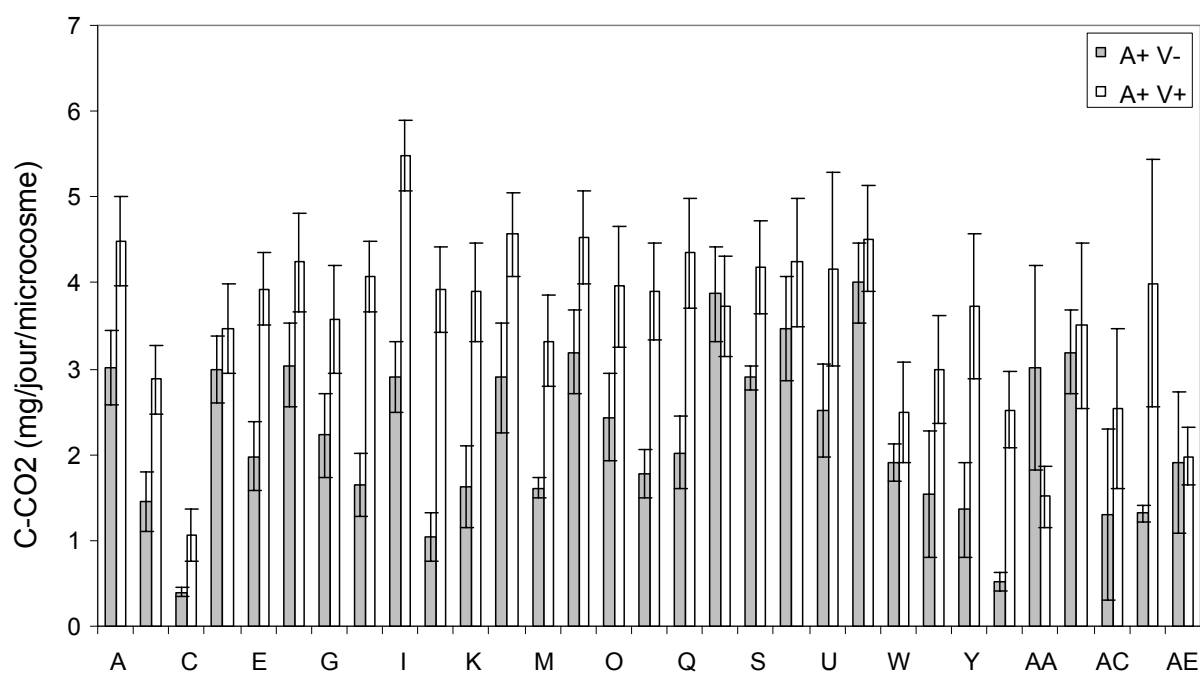
Carbone minéralisé sur sol avec vers



Dynamique du carbone en microcosmes sans vers, sans atrazine (S), avec vers et sans atrazine (SV), sans vers et avec atrazine (A⁺ V⁻) et avec vers, avec atrazine (A⁺ V⁺), au cours des 86 jours d'incubation.

Annexe 3

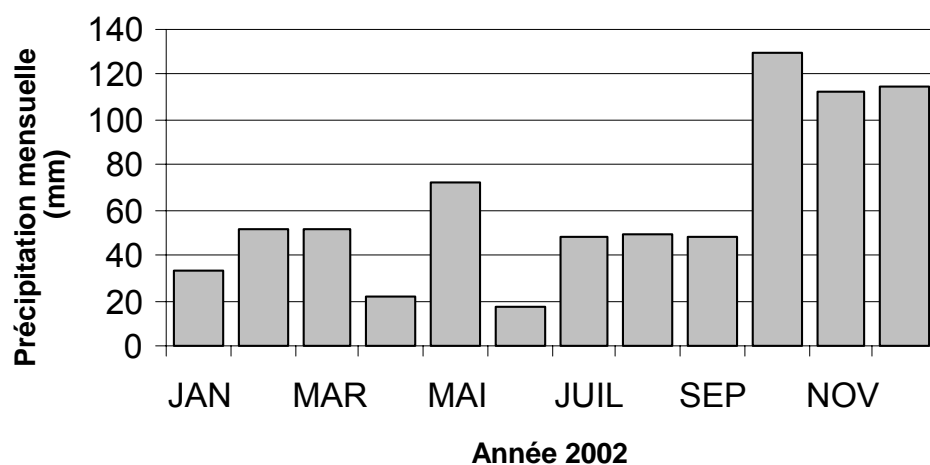
Dynamique du carbone minéralisé Exp.2



Dynamique du carbone en microcosmes sans vers et avec atrazine ($A^+ V^-$) et avec vers et avec atrazine ($A^+ V^+$), au cours des 62 jours d'incubation.

Annexe 4

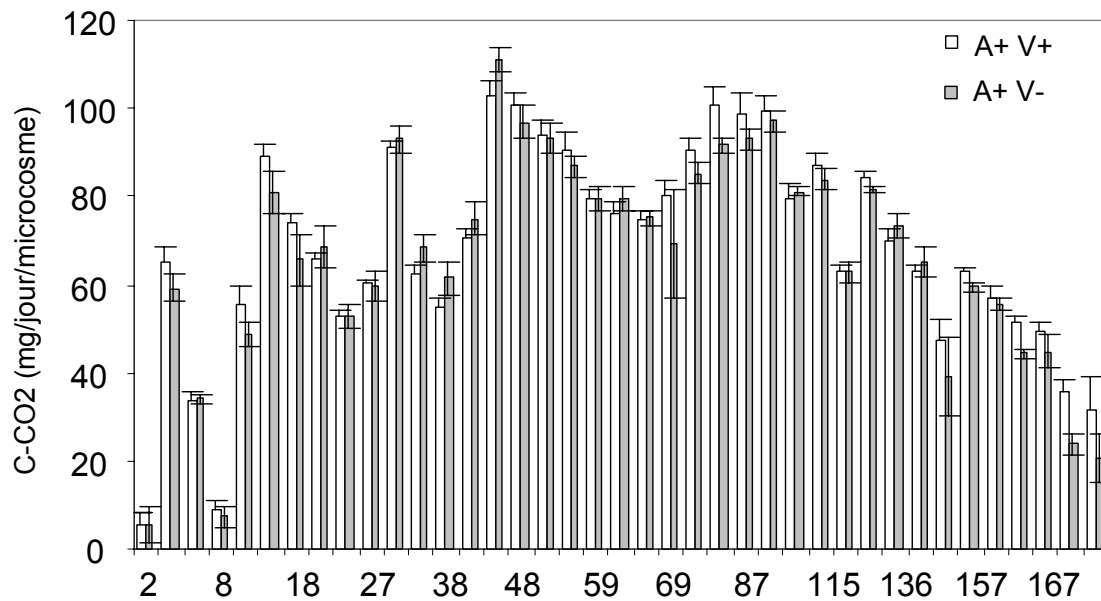
Pluviométrie de l'année 2002



Précipitations mensuelles sur la parcelle d'expérimentation (Vezin-Le-Coquet) où sont localisées les mésocosmes, pendant l'année 2002.

Annexe 5

Dynamique du carbone minéralisé Exp.4



Dynamique du carbone en mésocosmes sans vers et avec atrazine ($A^+ V^-$) et avec vers et avec atrazine ($A^+ V^+$), pendant 174 jours.

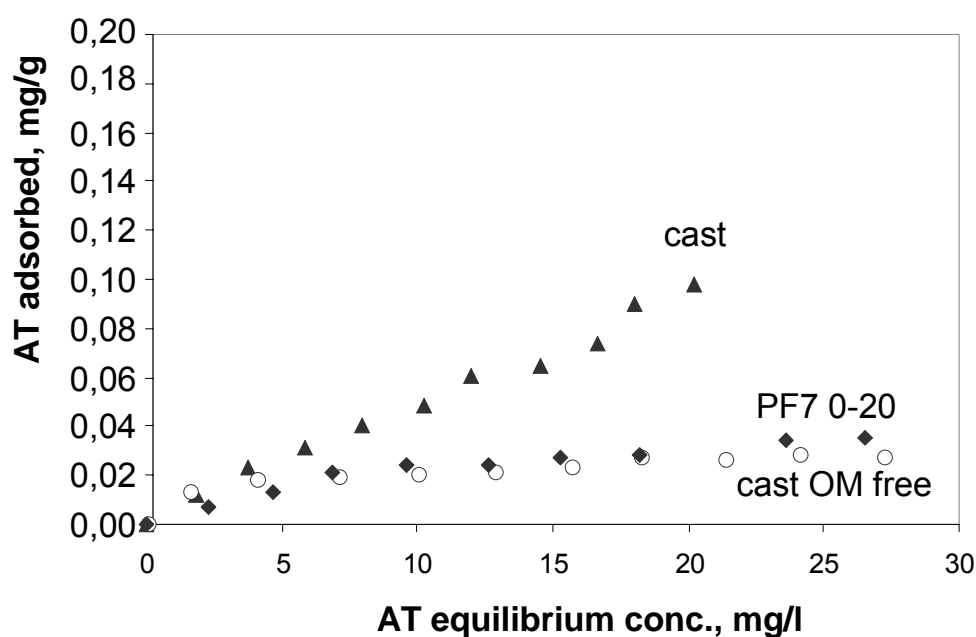
Annexe 6

Teneurs en azote et en carbone des échantillons de l'Exp. 1

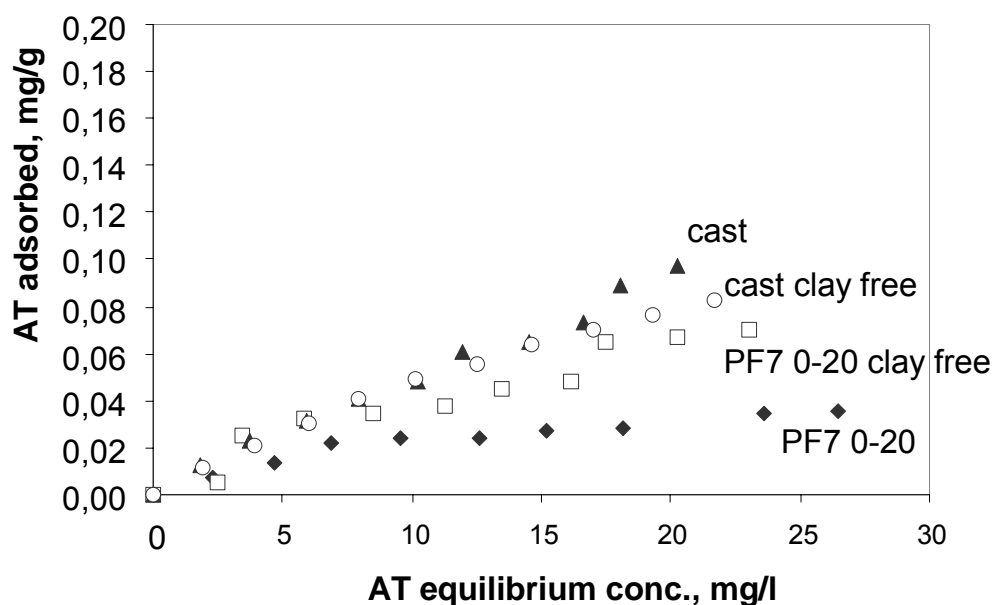
(Sol non remanié en présence de vers des niveaux 0-5 cm ; 5-10 cm ; 10-15 cm ;
Gal : parois de galeries ; End : endentères ; Tur : turricules).

Modalité	Microsite	Age	C%	Err Std	N%	Err Std	C/N	Err Std
A+ V-	0-5 cm	43j-	1,02	0,01	0,11	0,00	9,27	0,09
		86j-	1,01	0,03	0,11	0,00	9,01	0,14
	5-10 cm	43j-	0,98	0,00	0,11	0,00	8,87	0,04
		86j-	0,98	0,01	0,11	0,00	8,92	0,06
	10-15 cm	43j-	1,02	0,00	0,11	0,00	9,10	0,19
		86j-	1,05	0,00	0,12	0,00	8,81	0,09
A+ V+	0-5 cm	43j-	0,97	0,00	0,11	0,00	8,87	0,06
		86j-	0,60	0,03	0,06	0,01	9,79	0,54
	5-10 cm	43j-	0,97	0,00	0,11	0,00	8,81	0,02
		86j-	0,98	0,00	0,11	0,00	9,35	0,31
	10-15 cm	43j-	1,01	0,00	0,11	0,00	9,14	0,03
		86j-	1,02	0,02	0,11	0,00	8,94	0,11
	Gal	43j-	1,18	0,06	0,12	0,01	10,22	0,26
		86j-	1,08	0,01	0,11	0,00	9,66	0,19
	En	43j-	2,19	0,31	0,14	0,01	15,91	1,32
		86j-	1,93	0,12	0,14	0,00	13,92	0,49
	Tur	14j-	1,19	0,05	0,11	0,00	10,51	0,29
		28j-	1,19	0,05	0,11	0,00	10,56	0,27
		42j-	0,95	0,19	0,08	0,02	11,83	0,30
		56j-	1,16	0,04	0,11	0,00	10,27	0,08
		70j-	1,30	0,01	0,12	0,01	11,29	0,56
		86j-	0,64	0,05	0,05	0,00	12,84	0,96

Annexe 7



Atrazine adsorbée à la concentration d'équilibre dans le sol de zones humides (PF7 0-20), dans les turricules excrétés sur ce sol (casts) et les turricules excrétés sur ce sol dont la matière organique a été enlevée.



Atrazine adsorbée à la concentration d'équilibre dans le sol de zones humides (PF7 0-20), dans les turricules excrétés sur ce sol (casts) et ces mêmes microsites dont la fraction argileuse a été enlevée.